

**ZUR STEUERUNG DES WACHSTUMS UND DER MORPHOGENESE
VON KALLUSKULTUREN AUS CREPIS CAPILLARIS
DURCH LICHT UND PHYTOHORMONE**

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

vorgelegt

**dem Fachbereich Biologie
der Freien Universität Berlin**

von

Wolfgang Hüsemann

aus Buer / Bez. Osnabrück

1972

ZUR STEUERUNG DES WACHSTUMS UND DER MORPHOGENESE
VON KALLUSKULTUREN AUS CREPIS CAPILLARIS
DURCH LICHT UND PHYTOHORMONE

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung der Doktorwürde

vorgelegt

dem Fachbereich Biologie
der Freien Universität Berlin

von

Wolfgang Hüsemann
aus Buer / Bez. Osnabrück



1. Referent: Prof. Dr. J. Reinert

2. Referent: Prof. Dr. H. Clauss

Tag der Promotion: 12. Mai 1972

INHALT

<u>EINLEITUNG</u>	4
<u>MATERIAL UND METHODE</u>	6
<u>ERGEBNISSE</u>	14
I. Das Wachstum von Kalluskulturen unter verschiedenen Lichtbedingungen	
1. Steuerung der Wachstumsintensität durch verschiedene Lichtqualitäten	14
2. Der Einfluß von Kinetin auf das lichtgesteuerte Wachstum	16
3. Der Einfluß verschiedener Lichtqualitäten und Kinetin auf die Zellteilung und Zellstreckung	17
II. Die Bedeutung verschiedener Lichtqualitäten und Kinetin für	
1. Chlorophyllgehalt von Kalluskulturen	26
2. Proteingehalt	27
3. Intensität der Proteinsynthese	30
III. Reaktion langfristig adaptierter Kalluskulturen auf erneute Veränderung der Lichtbedingungen	
1. Wiederinduktion der Chlorophyllsynthese in farblosen Kalluskulturen	33
2. Veränderungen in der Wachstumsintensität ..	34
IV. Morphogenese	36
<u>DISKUSSION</u>	40
<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	53
<u>LITERATUR</u>	56

Digitized by the Internet Archive
in 2026

EINLEITUNG

Es ist bekannt, daß die einzelnen Spektralbereiche des Lichtes die Photomorphogenese der Pflanzen unterschiedlich beeinflussen (MOHR 1964). Bisher liegen jedoch nur wenige Befunde über den Einfluß des Lichtes auf Zellteilung und Zellstreckung in Geweben höherer Pflanzen vor (BJÖRN et al. 1964, HÄCKER et al. 1964), OHNO und FUJIWARA 1967). Gewebekulturen sind geeignete Objekte, um die Bedeutung des Lichtes für Wachstum und Entwicklung auf der Ebene der Zellen zu untersuchen (KLEIN 1964, REINERT und KÜSTER 1966, POLEVAYA 1966, 1967, BEAUCHESNE et al. 1970). Kalluszellen bieten den Vorteil, daß sie - herausgelöst aus dem komplexen System der intakten Pflanze und den damit verbundenen starken Korrelationen zwischen verschiedenen ausdifferenzierten Geweben - auf definierten Nährmedien in vitro kultiviert werden können.

Kulturen aus Blättern von *Crepis capillaris* bilden im Weißlicht Chlorophyll aus und erreichen Frischgewichtszunahmen von 150% bis 200% pro Übertragungsperiode. Im Dunkeln werden die Gewebe nach ca. 2 Monaten farblos und nach vollständigem Chlorophyllverlust nekrotisch (REINERT und KÜSTER 1966). Offensichtlich besteht eine Beziehung zwischen der Wachstumsfähigkeit der *Crepis*-Zellen und der Ausbildung von Chloroplasten. Im einfachsten Falle wäre an eine Bereitstellung von Photosyntheseprodukten zu denken, die zum Wachstum der Kalluskulturen erforderlich sind. Wie weiter fortführende Untersuchungen gezeigt haben, wird das Wachstum der *Crepis*-Zellen in starkem Maße durch Licht und die Stickstoffversorgung beeinflusst.

Chlorophyllsynthese findet nur im kurzwelligen Bereich der sichtbaren Strahlung statt, denn die *Crepis*-Zellen ergrünen nur im Blaulicht oder Weißlicht aber nicht im Rotlicht (HÜSEMANN 1970). Entscheidend für das Wachstum der Kalluskulturen aus *Crepis capillaris* ist

außer dem Licht die Form und die Menge des Stickstoffs im Nährmedium. Sind nur anorganische Stickstoffverbindungen vorhanden, so benötigen die Kulturen Blaulicht oder Weißlicht, um hohe Wachstumsraten zu erreichen. Wird das Nährmedium jedoch durch ein Albuminhydrolysat ergänzt, dann erreichen die chlorophyllfreien Kalluskulturen im Rotlicht oder im Dunkeln die absolut höchsten Frischgewichtszunahmen (HÜSEMANN 1970).

In der vorliegenden Arbeit wird die Bedeutung des blauen und roten Spektralbereichs für Wachstum (Zellteilung und Zellstreckung), Entwicklung sowie Chlorophyll- und Proteinsynthese untersucht, und zwar mit dem Ziel, lichtabhängige physiologische Veränderungen der Kalluszellen aus *Crepis capillaris* zu erfassen. Es wird weiter überprüft, ob die Wirkung des Lichtes durch Phytohormone beeinflusst bzw. ersetzt werden kann, denn es ist bekannt, daß zahlreiche Rotlichteffekte, die die Photomorphogenese pflanzlicher Gewebe betreffen, ebenfalls durch Phytohormone ausgelöst werden können (IKUMA und THIMAN 1960, FEIERABEND 1969). Außerdem ist von verschiedenen Seiten nachgewiesen worden, daß die morphogenetische Wirkung des Lichtes zur Steigerung der Synthese nativer Phytohormone führen kann (REID 1967, BEEVERS et al. 1970).

MATERIAL UND METHODE

Kalluskultur und Nährmedien

Versuchsmaterial waren chlorophyllhaltige Kalluskulturen aus Blättern von *Crepis capillaris*, die nach der Methode von REINERT und KÜSTER (1966) sowie HÜSEMANN (1968) isoliert und unter sterilen Bedingungen kontinuierlich im Dauerweißlicht bei 1650 Lux und $25 \pm 1^\circ \text{C}$ subkultiviert wurden. Als Kulturmedium diente ein 0,9%-iges Agarmedium, das die Nährsalze und organischen Verbindungen nach MURASHIGE und SKOOG (1962) enthielt. An Stelle des Albuminhydrolysats enthielt das Nährmedium eine äquivalente Menge Glutaminsäure und als Wachstoffsstoff $5 \times 10^{-9} \text{ g/ml}$ 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D). Dieses Kulturmedium wird im folgenden als SD-Medium bezeichnet (Tab. 1).

Die Nährlösung wurde mit 0,1 n NaOH auf einen pH-Wert von 5,7 - 5,8 eingestellt und nach Zugabe des aufgeschmolzenen Agars 20 Minuten bei 1 atü im Autoklaven sterilisiert. Für bestimmte Versuchsreihen wurde das SD-Medium durch Zugabe von Kinetin in einer Endkonzentration von 10^{-6} g/ml oder Gibberellin in den Konzentrationen von 10^{-6} , 10^{-8} oder 10^{-9} g/ml verändert. 2,4-D und Kinetin konnten zusammen mit dem Nährmedium sterilisiert werden. Gibberellin mußte jedoch mittels eines Bakterienfilters kalt sterilfiltriert und zum sterilisierten, auf ca. 30°C abgekühlten Nährmedium hinzugefügt werden. Die Kalluskultur erfolgte auf 10 ml Schrägagar in Kulturröhrchen ($\varnothing$ 2,2 cm; Länge 15 cm), die mit Aluminiumfolie verschlossen waren. Eine Subkulturperiode betrug jeweils 3 Wochen. Zur Zeit des Versuchs waren die Kalluskulturen 3 bis 6 Jahre alt.

Bestrahlung

Für die verschiedenen Versuchsreihen wurden die chlorophyllhaltigen *Crepis*-Kulturen auf SD-Medium aus dem Weißlicht ins Dunkel übertragen bzw. mit Dauerblaulicht, Dauer-

Tab. 1

SD - Medium

a) Mineralsalze nach MURASHIGE und SKOOG (1962).

Makroelemente			Mikroelemente		
NH_4NO_3	1650	mg/L	H_3BO_3	6,2	mg/L
KNO_3	1900	"	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,3	"
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	"	$\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	8,6	"
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	"	KJ	0,83	"
KH_2PO_4	170	"	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25	"
$\text{Na}_2\text{-EDTA}$	37,3	"	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025	"
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,8	"	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025	"

b) Organische Verbindungen nach MURASHIGE/SKOOG (1962)

Myo-Inositol	100	mg/L
Glycin	2	"
Nikotinsäure	0,5	"
Pyridoxin . HCl	0,5	"
Thiamin . HCl	0,1	"

c) Saccharose	30	g/L
2,4-Dichlorphenoxye oxyessigsäure (2,4-D)	5×10^{-9}	g/ml
Difco-Agar	9	g/L
Glutaminsäure	736	mg/L

d) Für bestimmte Versuchsreihen wurde das SD-Medium durch Zugabe von 10^{-6} g/ml Kinetin oder 10^{-6} und 10^{-9} g/ml Gibberellin ergänzt.

Die Angaben in g/ml bzw. g/L bezeichnen die Endkonzentration der Substanzen in der fertigen Nährlösung.

hellrotlicht oder Dauerdunkelrotlicht bestrahlt. Für die Kultur der Gewebe unter den verschiedenen Lichtbedingungen standen Konstanträume bzw. Klimatruhen mit den erforderlichen Bestrahlungsanlagen zur Verfügung. Lichtquellen waren Leuchtstoffröhren der Firma Osram Typ TL 40/25 für Weißlicht und der Firma Philips Typ TL 40/18 für Blaulicht und Typ TL 40/15 für Hellrotlicht. Das Blaulicht wurde zusätzlich durch ein blaues Signalglas mit einem Transmissionsmaximum bei 410 nm und das Hellrotlicht durch ein rotes Plexiglas (Nr. 501, 2mm) mit einem Transmissionsmaximum bei 660 nm gefiltert.

Als Dunkelrotlichtfeld diente eine Bestrahlungsanlage nach HARTMANN (1970). Über dem oberen Fenster einer Klimatruhe befanden sich 13 stabförmige Glühlampen vom Typ Osram-Linestra (120 W/220V; 100 cm lang). Als Filter dienten eine Lage Wärmeabsorptionsglas (Typ KG 3 / 2mm; Schott & Gen., Mainz) und das eigentliche Dunkelrotlichtfilter mit einem Transmissionsmaximum bei 740 nm, bestehend aus einer Plexiglasfilterkombination von 1 Platte Plexiglas rot (Nr. 501, 3mm) und 2 Platten Plexiglas blau (Nr. 627, 3mm) der Firma Röhm und Haas, Darmstadt. Unter dieser Anordnung hatte das Dunkelrotlicht ein Emissionsmaximum bei 740 nm und eine Halbwertsbreite von 100 nm (unterhalb von 680 weniger als 0,1%, oberhalb von 980 nm weniger als 5% des Maximalwertes).

Um vergleichbare Bestrahlungsbedingungen zu erhalten, wurde die Strahlungsenergie der verschiedenen Lichtqualitäten auf annähernd gleiche Quantenstromdichte nach der Methode von GAASTRA (1961) mit Hilfe einer geeichten Thermosäule nebst Galvanometer und vorgeschaltetem cos-i-Aufsatz eingestellt. Es standen somit folgende Lichtfelder von annähernd gleicher Quantenstromdichte zur Bestrahlung der Kalluskulturen zur Verfügung:

Dauerblaulicht	410 nm; 3600 erg/sec·cm ²
Dauerhellrotlicht	660 nm; 2240 erg/sec·cm ²
Dauerdunkelrotlicht	740 nm; 2000 erg/sec·cm ²

Wachstumsbestimmungen

Die Wachstumsbestimmungen durch Ermittlung der Frischgewichtszunahme der Kalluskulturen erfolgten jeweils am Ende einer 3-wöchigen Subkulturperiode. Jeder Versuchsan-
satz umfaßte mindestens 10 Kulturen. Das Ausgangsgewicht betrug im Durchschnitt 300 ± 30 mg. Die Wachstumsintensität wird als Zunahme in % Frischgewicht pro Kulturperiode definiert.

Bestimmung der Zellzahl und Zellteilungsintensität

Als weiteres Wachstumskriterium wurde die Zellteilungsintensität der Kalluskulturen untersucht. Zur Ermittlung der Zellzahl wurden Gewebeprobe mit einer Genauigkeit von ± 1 mg ausgewogen, ca. 2 Stunden in 5 ml 10%-iger Chromsäure mazeriert und das Mazerationsgemisch zur vollständigen Auftrennung der Gewebe in Einzelzellen bzw. wenigzellige Komplexe mehrmals durch eine feine Kapillare gesaugt und dann auf die Felder der Zählkammer nach Fuchs-Rosenthal (0,2 mm tief) aufgetragen. Für jede Probe mußten aus statistischen Gründen 4 bis 6 komplette Felder ausgezählt werden, was einer Anzahl von 600 bis 800 Zellen entsprach.

Die Zellteilungsintensität wurde aus dem Zuwachs an Zellen pro Kulturperiode berechnet. Aus der Anfangs- (N_0) und Endzahl (N_t) der Zellen pro Kultur ließ sich die Anzahl der Teilungsschritte (n) pro Zelle berechnen (STREET und HENSHAW 1966):

$$N_t = N_0 \times 2^n \quad ; \quad n = \frac{\log N_t - \log N_0}{\log 2}$$

Unter der Voraussetzung, daß alle Zellen sich teilen, entsprechen die Zellgenerationen pro Kulturperiode der Anzahl von Teilungsschritten, die jede Zelle durchläuft und sind ein Maß für die Intensität der Zellteilungen.

Chlorophyllbestimmung

Extraktion und photometrische Bestimmung des Chlorophylls erfolgten in 80%-igem Aceton. Das Gewebe wurde schonend in kaltem 80%-igem Aceton homogenisiert und zur vollständigen Extraktion 10 Minuten im Kühlschrank aufbewahrt. Das Extraktionsmedium enthielt außerdem Magnesiumcarbonat, um den sauren Zellsaft abzupuffern und einen säurebedingten Abbau des Chlorophylls zu Phäophytinen zu verhindern. Zur photometrischen Bestimmung der Chlorophyllextrakte stand ein Spektralphotometer, Typ Hitachi, zur Verfügung. Die Berechnung der Konzentrationen von Chlorophyll a und b erfolgte nach der Formel von ZIEGLER und EGLE (1965).

$$C_{\text{Chlorophyll a}} = 11,78 \times E_{664} - 2,29 \times E_{647}$$

$$C_{\text{Chlorophyll b}} = 20,05 \times E_{647} - 4,77 \times E_{664}$$

E = Extinktionswerte der Chlorophyllextrakte bei den jeweiligen Wellenlängen.

Die Konzentration C (mg/l) wurde in µg Chlorophyll pro g Frischgewicht umgerechnet.

Proteinbestimmung

Am Ende der 3-wöchigen Subkulturperiode wurden Kalluskulturen mit aqua bidest von anhaftendem Nähragar gesäubert, zum schnellen Einfrieren mit flüssigem Stickstoff übergossen, 48 Stunden lang gefriergetrocknet, anschließend fein pulverisiert und mit einer Genauigkeit von $\pm 0,1\text{mg}$ direkt in Mikrokjeldahl-Röhrchen eingewogen. Jede Probe enthielt maximal 8 mg Trockenpulver und blieb, mit 1,5 ml kalter 10%-iger Trichloressigsäure versetzt, zur vollständigen Fällung der Proteine über Nacht im Kühlschrank stehen. Nach Abzentrifugieren, Dekantieren des Überstandes und 3-maligem Waschen mit 80%-igem Äthanol zur Entfernung der löslichen Stickstoffverbindungen und des Chlorophylls wurde der Rückstand nach der Mikro-kjeldahl-Methode aufgeschlossen (CLEGHORN und JENDRASSIK 1934) und

der Proteinstickstoff nach Zugabe von Neßlers'-Reaganz photometrisch bei 436 nm in einem Filterphotometer gemessen. Die den Extinktionswerten entsprechenden Stickstoffkonzentrationen konnten einer gesondert aufgestellten $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Eichkurve entnommen werden und ergaben mit dem empirischen Faktor 6,25 multipliziert den Proteingehalt der jeweiligen Probe (HINSBERG und LANG 1951).

Einbau von radioaktiv markiertem ^{14}C -Leucin

Die Intensität der Proteinsynthese wurde durch den Einbau von uniform markiertem ^{14}C -Leucin mit einer spezifischen Aktivität von 262 mci/mMol bestimmt. Das Inkubationsmedium enthielt 1,25 μci ^{14}C -Leucin / 5 ml Nährlösung. Die Kulturen wuchsen zunächst 13 Tage auf normalem Nährboden und anschließend 4 Tage auf dem Inkubationsmedium. Nach Abschluß der 4-tägigen Inkubation wurden die Kulturen von anhaftendem Nährboden mit aqua bidest. gesäubert und mit kalter 10%-iger Trichloressigsäure homogenisiert, die 1 mg / ml Albuminhydrolysat enthielt. Dieses Aminosäuregemisch war erforderlich, um nicht-proteingebundenes ^{14}C -Leucin auszutauschen. Zur vollständigen Fällung der Proteine blieb die TCE-Suspension über Nacht im Kühlschrank stehen. Anschließend wurde das Homogenat 30 Minuten bei 5000 UpM bei 5° C abzentrifugiert und der klare Überstand dekantiert. Aus dem Rückstand mußten die löslichen Stickstoffverbindungen durch 3-maliges Waschen mit 80%-igem Äthanol entfernt werden. Um ebenfalls radioaktiv markierte Nukleinsäuren oder Stärke zu beseitigen, mußte der Rückstand mit 1 n Perchlorsäure 20 Minuten bei 70° C inkubiert, abzentrifugiert und zur Entfernung restlicher Säure nochmals mit 50%-igem Äthanol gewaschen werden. Aus dem vorgereinigten Proteinrückstand wurden durch Inkubation mit 1 n Natronlauge (45 Minuten bei 60° C) die Proteine in Lösung gebracht und mit Natronlauge auf ein Endvolumen von 3 ml aufgefüllt.

1. Bestimmung der Einbaurate von ^{14}C -Leucin

Aus 1 ml der alkalischen Proteinlösung wurden die Proteine durch Zugabe von 2 ml 1 n Trichloressigsäure erneut ausgefällt, mit 1 ml 2 n Ammoniaklösung wieder in Lösung gebracht und anschließend von jeder Probe 50 μl auf silikongefettete Aluminiumschälchen aufgetragen und unter einer Infrarotlampe zur Trockne eingengt. Die Überführung der Proteine in ammoniakalische Lösung war erforderlich, denn Natronlauge zerstörte die Oberfläche der Aluminiumschälchen. Die Aktivität der Proteinproben wurde im Methandurchflußzähler gemessen und als Impulse pro Minute pro mg Protein (IpM / mg Protein) ausgewertet.

2. Proteingehalt der radioaktiv markierten Proben

Nach Ausfällung der Proteine aus der alkalischen Lösung durch Zugabe von 1 n Trichloressigsäure erfolgte der Aufschluß nach der Mikrokjeldahl-Methode und die photometrische Bestimmung des Stickstoffs nach Zugabe von Neßlers'-Reagenz. Aus Sicherheitsgründen mußte das beim Aufschluß freigesetzte radioaktiv markierte $^{14}\text{CO}_2$ in Natronlauge aufgefangen werden.

Chemische Substanzen

Die verwendeten chemischen Substanzen bzw. Lösungen waren analysenrein, hatten den Reinheitsgrad "reinst" oder Arzneibuchqualität (DAB 7).

Fehlerrechnung

Die statistische Auswertung der Versuchsergebnisse erfolgte nach dem t-Test (PÄTAU 1943). Wenn es notwendig war, wurde die Fehlergrenze der Meßergebnisse als 3-facher mittlerer Fehler vom Mittelwert angegeben.

Frischgewichtszunahme in %

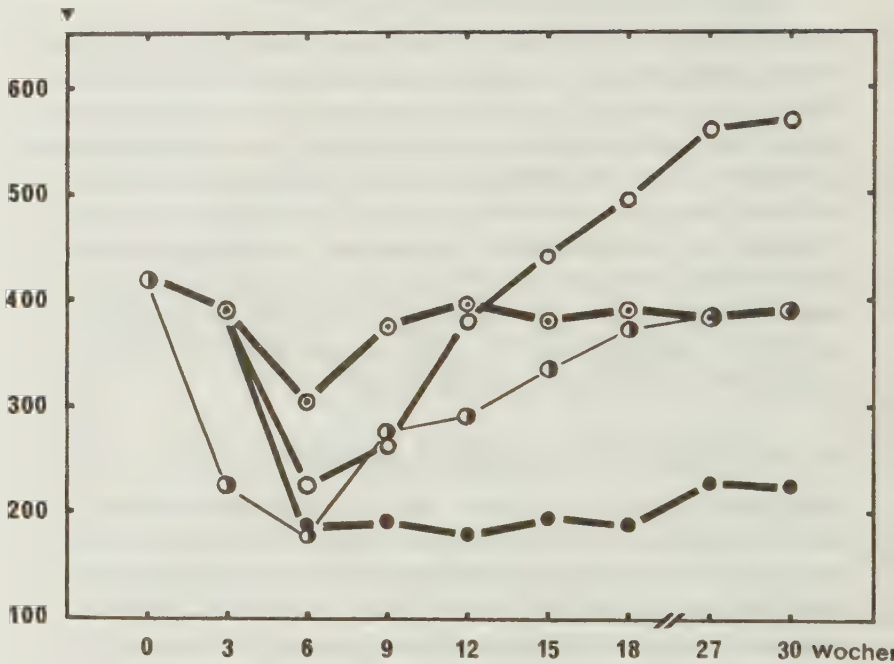


Abb. 1 Der Einfluß verschiedener Lichtqualitäten auf das Wachstum von Kalluskulturen aus *Crepis capillaris*.

○—○ Dauerblaulicht, ○—○ Dauerhellrotlicht,
○—○ Dauerdunkelrotlicht, ●—● Dunkel.

Ordinate: Zunahme in % Frischgewicht/Kulturperiode
Abszisse: Kulturzeit in Wochen

Kulturbedingungen: SD-Medium. Im Weißlicht erreichten die Kulturen Frischgewichtszunahmen von 420%.

ERGEBNISSE

I/1 Steuerung der Wachstumsintensität durch verschiedene Lichtqualitäten

Die Frischgewichtszunahme chlorophyllhaltiger Kalluskulturen aus *Crepis capillaris*, die auf SD-Medium wuchsen, betrug durchschnittlich 420% innerhalb einer 3-wöchigen Subkulturperiode. Übertragung der Kulturen aus dem Weißlicht ins Blaulicht, Hellrotlicht bzw. Dunkelrotlicht oder ins Dunkel veränderte die Wachstumsgeschwindigkeit, den Chlorophyllgehalt und die Konsistenz der Gewebe. Nach 8-10 Wochen Kultur im Hellrotlicht, Dunkelrotlicht oder im Dunkeln waren die Kalluskulturen chlorophyllfrei. Die ursprünglich festen und kompakten Weißlichtkulturen bildeten im Hellrotlicht lockeres, weiches Gewebe, blieben im Dunkelrotlicht sowie im Blaulicht aber fest. Insbesondere im Dunkeln entwickelten sich härtere Gewebe als bei den Weißlichtkulturen.

Ganz generell führte farbiges Licht zunächst zu einer - im Vergleich zum Weißlicht - deutlichen Verringerung der Wachstumsgeschwindigkeit (Abb. 1). Nach einer Adaptationsphase (ca. 6 Wochen), die ungefähr die gleiche Zeitspanne umfaßte, welche die Gewebe benötigten um chlorophyllfrei zu werden, stieg die Frischgewichtszunahme der Blaulicht- und Rotlichtgewebe wieder an, während im Dunkeln die niedrige Wachstumsrate mit 200% bis 220% Frischgewichtszunahme pro Übertragungsperiode erhalten blieb. Nach einer Gesamtkulturzeit von 27 bis 30 Wochen war das Wachstum sämtlicher Kalluskulturen annähernd konstant. Im Dunkeln wurde das Wachstum der *Crepis*-Zellen am stärksten gehemmt (220% Frischgewichtszunahme), im Hellrotlicht am intensivsten gefördert (570% Frischgewichtszunahme). Im Dunkelrotlicht und Blaulicht erreichten die *Crepis*-Kulturen identische Wachstumsraten mit Frischgewichtszunahmen von 380% bis 390%, die einerseits signifikant höher ($p < 0,0027$) als die Dunkelwerte,

Frischgewichtszunahme in %

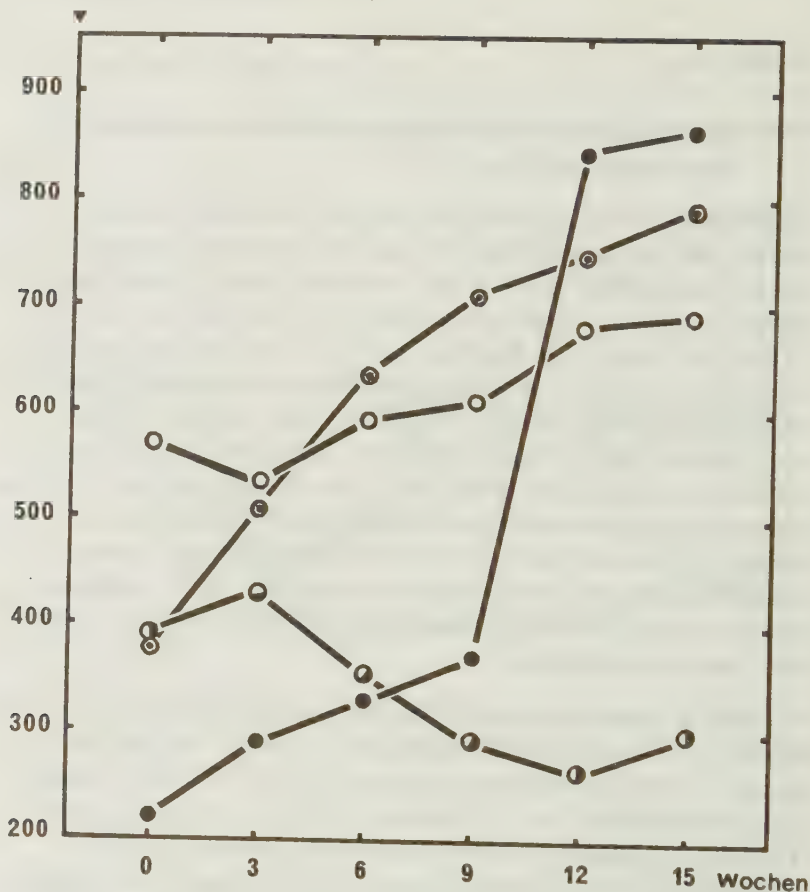


Abb. 2 Der Einfluß von Kinetin auf das lichtgesteuerte Wachstum von Kalluskulturen aus *Crepis capillaris*.

○—○ Dauerblaulicht, ○—○ Dauerhellrotlicht
 ○—○ Dauerdunkelrotlicht, ●—● Dunkel.
 Ordinate: Zunahme in % Frischgewicht/Kulturperiode
 Abszisse: Kulturzeit in Wochen
 0 Wochen: Frischgewichtszunahme der Kulturen vor
 Zugabe von Kinetin.
 Kulturbedingungen: SD-Medium + Kinetin (10^{-6} g/ml).

andererseits aber eindeutig niedriger ($p < 0,0027$) als die Hellrotlichtwerte waren.

2. Der Einfluß von Kinetin auf das lichtgesteuerte Wachstum

Durch die folgenden Untersuchungen sollte festgestellt werden, ob und welche Wirkung Kinetin auf das lichtgesteuerte Wachstum der Kalluszellen hat und ob der wachstumsfördernde Effekt des Hellrotlichts durch Kinetin ersetzt werden kann. Dazu wurden Kulturen, die mehr als 30 Wochen lang im Blaulicht, Rotlicht oder im Dunkeln wuchsen, auf SD-Medium mit Kinetin übertragen.

Kinetin bewirkte drastische Veränderungen im Wachstum der Crepis-Kulturen (Abb. 2). Bereits nach 3 Wochen bildete sich an den Dunkelrotlicht- und Dunkelkulturen helles, sehr weiches und schnell wachsendes Gewebe aus. Die Frischgewichtszunahme dieser Kulturen stieg während der folgenden Übertragungsperioden kontinuierlich an. Die Dunkelrotlicht- und Dunkelkulturen erreichten nach 12-15 Wochen Kulturzeit nach der Übertragung auf Kinetin-haltiges Medium annähernd konstant bleibende Wachstumsraten mit Frischgewichtszunahmen von 790% bzw. 860% innerhalb einer 3-wöchigen Übertragungsperiode. Das Wachstum der Hellrotlichtkulturen wurde durch Kinetin zwar ebenfalls gefördert, lag mit 690% Frischgewichtszunahme aber signifikant niedriger als bei den Dunkelkulturen. Im Gegensatz dazu konnte das Wachstum der Crepis-Kulturen im Blaulicht durch Kinetin nicht gefördert werden. Die Frischgewichtszunahme der Blaulichtgewebe fiel sogar von ursprünglich 390% auf 300% pro Subkulturperiode ab und war eindeutig niedriger als im Rotlicht oder im Dunkeln ($p < 0,0027$).

Aus Tabelle 2 ist die Signifikanz der Kinetin-induzierten Wachstumsveränderungen an Kalluskulturen aus *Crepis capillaris* ersichtlich.

Tab. 2 Kinetin-induzierte Wachstumsveränderungen
an Kalluskulturen aus Crepis capillaris

Die angegebenen Daten sind Durchschnittswerte der Frischgewichtszunahmen von Kalluskulturen bei verschiedenen Lichtbedingungen. Spalte 1 - nach 30-wöchiger Subkultur auf SD-Medium ohne Kinetin, Spalte 2 - nach 15-wöchiger Subkultur auf SD-Medium mit Kinetin. Die Kinetinkonzentration betrug 10^{-6} g/ml.

Bestrahlung	Frischgewichtszunahme in % pro Kulturperiode		Signifikanz der Änderungen
	○ ohne Kinetin	mit Kinetin	
Blaulich	390	300	p = 0,01
Hellrotlicht	570	690	p = 0,01
Dunkelrotlicht	380	790	p < 0,0027
Dunkel	220	860	p < 0,0027

Kinetin veränderte den Einfluß des Lichtes auf das Wachstum der Kalluskulturen aus *Crepis capillaris*. Ursprünglich vorhandene Wachstumshemmungen im Dunkeln oder Dunkelrotlicht (Tab. 2, Spalte 1) wurden aufgehoben und sogar in signifikante Wachstumsförderungen umgekehrt (Tab. 2, Spalte 2). Kinetin konnte somit den wachstumsfördernden Effekt des Hellrotlichts vollständig ersetzen und sogar noch steigern, da die Frischgewichtszunahmen der Kulturen auf SD-Medium mit Kinetin im Dunkeln bzw. Dunkelrotlicht signifikant höher lagen ($p < 0,0027$) als auf SD-Medium im Hellrotlicht (Tab. 2, Spalte 2 und 1).

3. Der Einfluß verschiedener Lichtqualitäten und Kinetin auf die Zellteilung und Zellstreckung

Die folgenden Untersuchungen zeigen, daß Zellteilung und Zellstreckung - entsprechend der Frischgewichtszunahme der Kulturen - durch Licht und Kinetin beeinflusst werden. Da die Intensität der Zellteilung aus dem

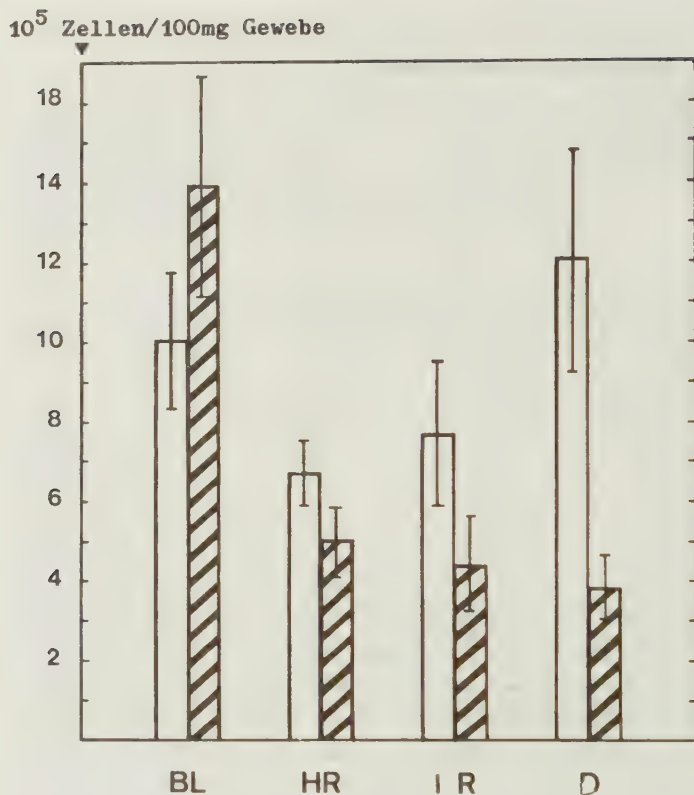


Abb. 3 Der Einfluß verschiedener Lichtqualitäten und Kinetin auf die Zellzahl/100mg Gewebe.

Die angegebenen Daten sind Mittelwerte von Zählungen an mindestens 10 verschiedenen Kulturen.
Die Kulturen auf SD-Medium + Kinetin wuchsen vor Zugabe des Kinetins bereits 30 Wochen auf SD-Medium unter den jeweiligen Lichtbedingungen.

□ ohne Kinetin, ▨ mit Kinetin 10^{-6} g/ml.

BL = Blaulicht, HR = Hellrotlicht, DR = Dunkelrotlicht, D = Dunkel.

Zuwachs an Zellen pro Kulturperiode berechnet wird, war es erforderlich, zunächst die Zellzahl pro Gewichtseinheit Gewebe zu bestimmen.

Nach einer Gesamtkulturzeit von 30 Wochen auf SD-Medium bzw. zusätzlich 12 bis 15 Wochen auf SD-Medium mit Kinetin blieben außer der Frischgewichtszunahme auch die Anzahl der Zellen pro 100mg Gewebe annähernd konstant. Die Kulturen auf SD-Medium im Dunkeln oder im Blaulicht hatten mit 1.203.000 bzw. 1.012.000 die absolut höchste Zellzahl/100mg Gewebe, während die Werte der Dunkelrotlicht- oder Hellrotlichtkulturen mit 784.000 bzw. 666.000 Zellen/100mg Gewebe signifikant niedriger waren ($p < 0,0027$). Zugabe von Kinetin veränderte die Zellzahl pro 100 mg Gewebe. Die Anzahl der Zellen nahm vom Blaulicht (1.399.000) über Hellrotlicht (493.000), Dunkelrotlicht (439.000) zum Dunkeln (380.000) ab, wie in Abb. 3 dargestellt ist. Die Unterschiede zwischen Blaulicht einerseits und Rotlicht bzw. Dunkel andererseits waren signifikant ($p < 0,0027$). Dagegen unterschieden sich die Werte der Rotlicht und Dunkelkulturen nicht eindeutig ($p = 0,01$).

1) Zellteilung

Setzt man voraus, daß alle Zellen sich gleichmäßig teilen, so konnte man aus der Anfangs- (N_0) und Endzahl (N_t) der Zellen pro Kultur die Anzahl der Teilungsschritte (n) pro Zelle berechnen. Diese Voraussetzung ist insofern eine Vereinfachung, da die Zellteilung vorwiegend in den meristematischen Zellkomplexen der Kalluskulturen abläuft, während in parenchymatischen Zellen nach Beginn der Zellstreckung die Teilungsfähigkeit stark reduziert wird. Somit kann die angegebene Formel zur Berechnung der Zellteilungsintensität nur einen Mittelwert aus hoher und niedriger Teilungsaktivität bezogen auf die gesamte Zellpopulation der Kulturen angeben.

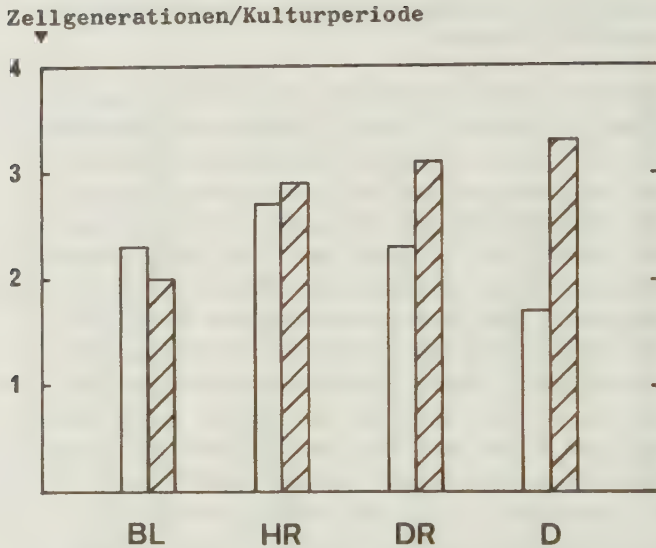


Abb. 4 Die Wirkung von Licht und Kinetin auf die Zellteilungsintensität in Kalluskulturen aus *Crepis capillaris*.

▨ SD-Medium mit Kinetin 10^{-6} g/ml
□ SD-Medium ohne Kinetin

BL = Blaulicht, HR = Hellrotlicht, DR = Dunkelrotlicht, D = Dunkel.

Die Zellgenerationen/Kulturperiode entsprechen der Anzahl von Teilungsschritten, die die einzelne Zelle in der exponentiellen Wachstumsphase durchläuft. Die Berechnung der Zellteilungsintensität erfolgte aus den Meßwerten der Frischgewichtszunahmen und der Zellzählungen (Tab. 2 und 3).

In den vorliegenden Untersuchungen wurde die Teilungsfrequenz der Zellen (= Zellgenerationen pro Kulturperiode) aus den Mittelwerten der Frischgewichtszunahmen und Zellzählungen berechnet (vgl. Tab. 2 und Abb. 3).

Die Teilung der Kalluszellen, die auf SD-Medium ohne Kinetin wuchsen, wurde in allen Fällen durch Licht gefördert, wobei die einzelnen Spektralbereiche unterschiedlich wirkten (Abb. 4). Hellrotlicht förderte die Zellteilung am stärksten. So teilten sich die Kalluszellen im Hellrotlicht durchschnittlich 2,7-mal, im Blaulicht oder Dunkelrotlicht dagegen nur 2,3-mal pro Übertragungsperiode. Dunkelkultur hemmte die Zellteilung am stärksten. Die Kalluszellen erreichten dort lediglich 1,7 Zellgenerationen pro Kulturperiode. In Gegenwart von Kinetin hemmte Licht, insbesondere Blaulicht, die Teilung der Kalluszellen. Im Blaulicht teilten sich die Zellen durchschnittlich nur 2-mal während einer Kulturperiode. Durch längerwelliges Licht wurde die Zellteilung weniger stark gehemmt. So konnten sich die Crepis-Zellen im Hellrotlicht oder Dunkelrotlicht bereits 2,9 bzw. 3,1-mal im Durchschnitt teilen. Optimale Teilungsbedingungen waren dagegen im Dunkeln gegeben. Hier durchliefen die Kalluszellen durchschnittlich 3,3 Zellgenerationen während einer Kulturperiode.

b) Zellstreckung

Die Crepis-Kulturen hatten - in Abhängigkeit von der eingestrahlten Lichtqualität und den verwendeten Nährmedien - sehr unterschiedliche Anzahlen von Zellen. Wie ein Vergleich zwischen Frischgewichtszunahme und Zellzahl/100mg Gewebe zeigt, hatten schnell wachsende Kalluskulturen mit hohen Frischgewichtszunahmen bedeutend weniger Zellen pro 100mg Gewebe als solche mit geringen Frischgewichtszunahmen (Abb. 5). Die Wachstums-

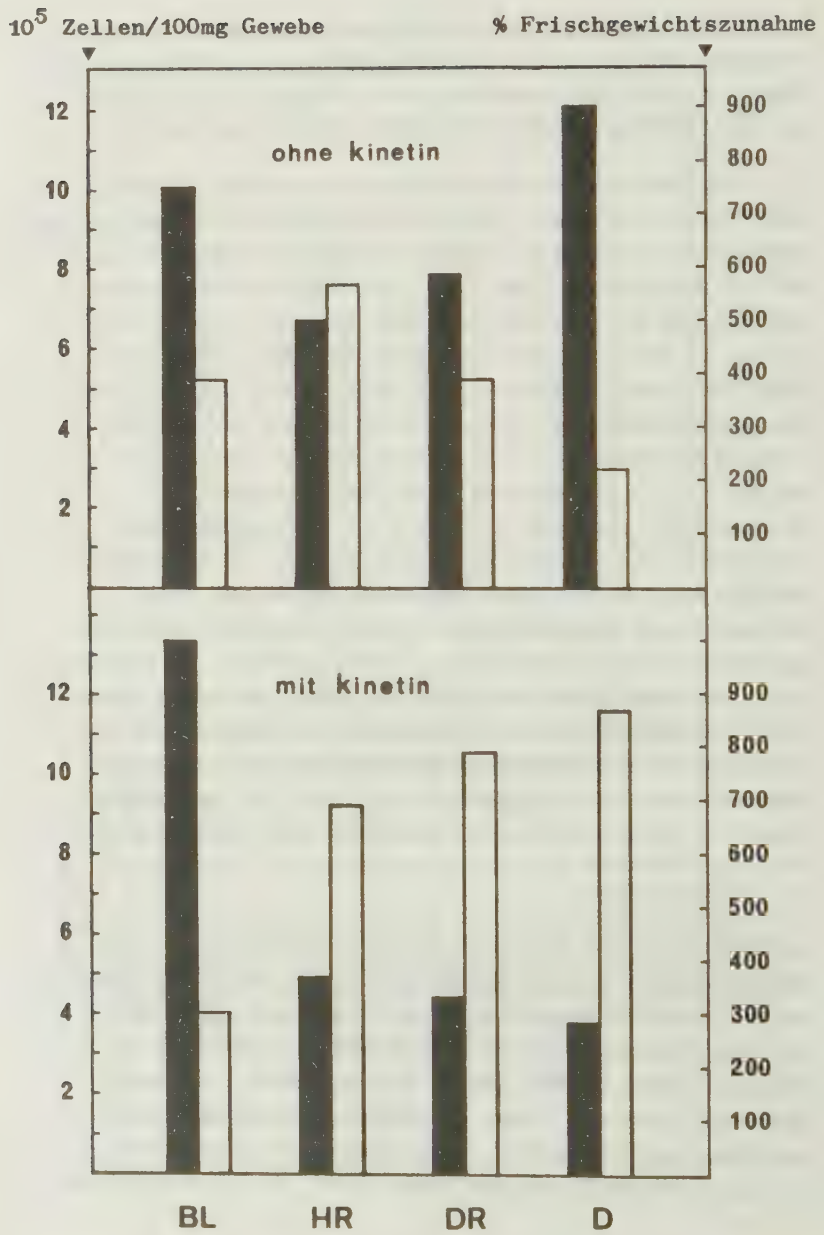


Abb.5

intensität war annähernd proportional der Zellanzahl. Unter der Voraussetzung, daß die Zellen nicht durch Akkumulation von Inhaltsstoffen bzw. Wandmaterial schwerer geworden waren, mußte die Zellzahl/100mg Gewebe annähernd umgekehrt proportional der Zellgröße sein und war somit ein indirektes Kriterium für die Intensität des Streckungswachstums der Zellen. Die Größenverhältnisse der Zellen in Schnittpräparaten von Kalluskulturen (Tafel I) entsprachen dem in Abb. 5 dargestellten Vergleich zwischen Wachstumsintensität und Zellzahl. Generell war eine Wachstumsförderung der Kalluskulturen stets mit einer Steigerung des Streckungswachstums der Zellen verbunden. Sowohl Kinetin als auch Hellrotlicht konnten das Streckungswachstum der Zellen fördern. Das Phytohormon war der Rotlichtwirkung jedoch deutlich überlegen (Tafel I a und b). Dies geht besonders auffallend aus einem Vergleich der Zellgrößen der im Dunkeln bzw. Dunkelrotlicht gehaltenen Kulturen in Gegenwart und beim Fehlen von Kinetin hervor. Nach Zugabe von Kinetin erreichten die Zellen der Dunkelrotlicht- oder Dunkelkulturen das absolut stärkste Streckungswachstum. In Abwesenheit von Kinetin lag die Zellgröße im Hellrotlicht deutlich über derjenigen der im Dunkeln, Dunkelrotlicht oder Blaulicht gehaltenen Kalli. Zusatz von Kinetin führte im Hellrotlicht jedoch nur zu einer offensichtlich geringen Förderung der Zellgröße. Ganz anders reagierten auf Kinetin die mit Blaulicht bestrahlten Kalluskulturen, denn Kinetin konnte das Streckungswachstum der chlorophyllhaltigen Zellen im Blaulicht nicht fördern.

Abb. 5 Vergleich zwischen Frischgewichtszunahme
und Zellzahl von Kalluskulturen

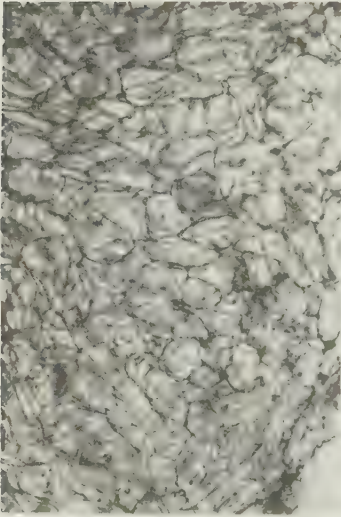
■ Zellen/100mg Gewebe, □ Frischgewichtszunahme in %
BL = Blaulicht, HR = Hellrotlicht, DR = Dunkelrotlicht,
D = Dunkel

Kulturbedingungen: SD-Medium ohne Kinetin
SD-Medium mit Kinetin 10^{-6} g/ml.

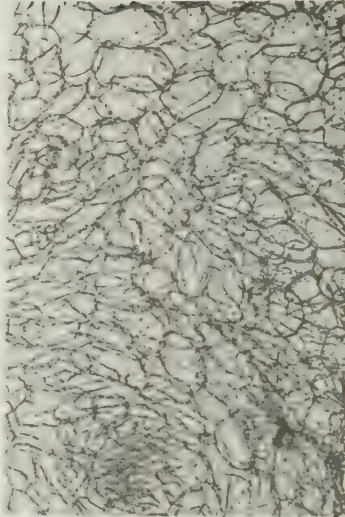
a) ohne Kinetin

b) mit Kinetin

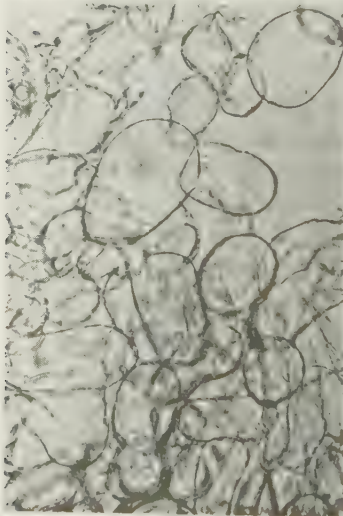
BL



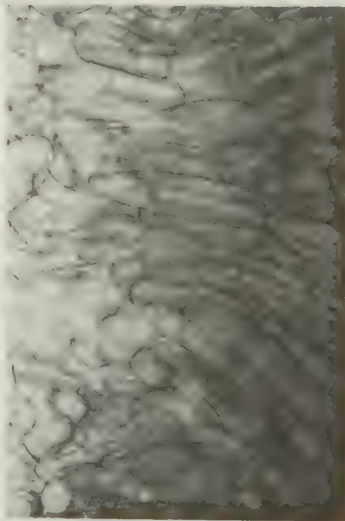
BL



HR



HR

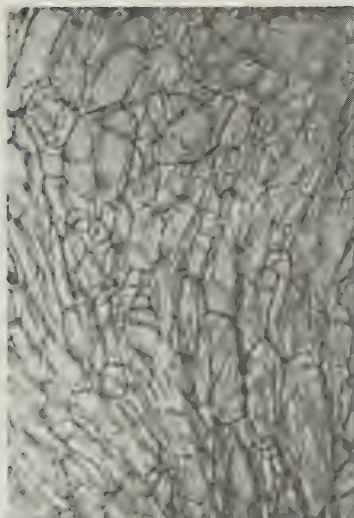


Tafel I Vergleich der Zellgrößen in Handschnittpräparaten aus Kalluskulturen von *Crepis*, kultiviert auf SD-Medium ohne Kinetin (a) sowie

a) ohne Kinetin

b) mit Kinetin

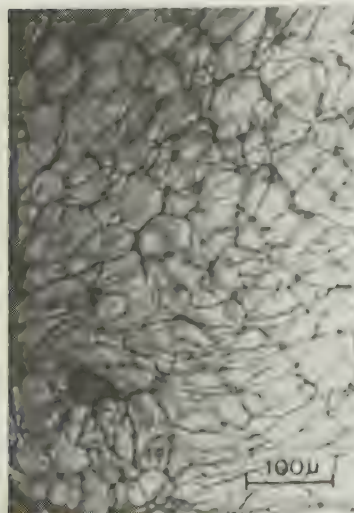
DR



DR



D



D



auf SD-Medium mit Kinetin 10^{-6} g/ml (b) unter verschiedenen Lichtbedingungen.

BL = Blaulicht, HR = Hellrotlicht, DR = Dunkelrotlicht,
D = Dunkel.

II/1 Chlorophyllgehalt von Kalluskulturen

Kalluskulturen aus *Crepis capillaris* bildeten nur im Weißlicht oder Blaulicht Chlorophyll aus, und zwar enthielten die Gewebe im Blaulicht mit 60 µg/ g Frischgewicht erheblich mehr Chlorophyll als im Weißlicht (42 µg Chlorophyll/ g Frischgewicht). Bestrahlung der grünen Gewebe mit Rotlicht führte zu einer allmählichen Chlorophyllabnahme genauso wie sie im Dunkeln eintrat. Nach 3 Wochen Rotlicht enthielten die Kulturen mit 16 µg nur noch 27%, nach 6 Wochen Rotlicht mit 9 µg Chlorophyll pro g Frischgewicht sogar nur noch 15% des Chlorophylls der Blaulichtgewebe (Tab. 3). Aber es dauerte 8-10 Wochen bis in den Rotlichtkulturen keine meßbaren Chlorophyllmengen mehr nachgewiesen werden konnten.

Tab. 3 Der Einfluß verschiedener Lichtqualitäten auf den Chlorophyllgehalt von Kalluskulturen aus *Crepis capillaris*.

Die chlorophyllhaltigen Kulturen wurden aus dem Weißlicht in annähernd quantenstromgleiches Blaulicht oder Hellrotlicht gebracht. Die angegebenen Daten sind Mittelwerte aus jeweils 6 Einzelbestimmungen.
Kulturbedingungen: SD-Medium

ug Chlorophyll / g Frischgewicht			
Dauer- weißlicht	Dauer- blaulicht	Dauerhellrotlicht	
6 Wochen	6 Wochen	3 Wochen	6 Wochen
42 ± 10	60 ± 18	16 ± 6	9 ± 4

Zugabe von Kinetin reduzierte den Chlorophyllgehalt der *Crepis*-Zellen beträchtlich. So enthielten die Kulturen, die 12 Wochen im Blaulicht auf SD-Medium + Kinetin (10^{-6} g/ml) wuchsen, mit 24 µg Chlorophyll/g Frischgewicht nur noch 40% des Chlorophylls der Kontrollkulturen auf SD-Medium.

2. Proteingehalt

Bisher wurde das Wachstum durch die Parameter Frischgewichtszunahme, Zellteilung und Zellstreckung definiert und gemessen. Im folgenden soll die Proteinsynthese als weiteres spezifisches Kriterium der Wachstums- und Stoffwechselaktivität der Zellen untersucht werden, da die Proteinsynthese ein wesentlicher Bestandteil des Plasmawachstums ist.

Tab. 4 Der Einfluß verschiedener Lichtqualitäten und Kinetin auf den Proteingehalt von Kalluskulturen

Licht- bedingungen	SD-Medium		SD-Medium + Kinetin	
	$\mu\text{g Protein pro}$ mg TG	100mg FG	$\mu\text{g Protein pro}$ mg TG	100mg FG
Blaulicht	121 $\pm$ 9	856 $\pm$ 125	103 $\pm$ 10	726 $\pm$ 69
Hellrotlicht	78 $\pm$ 8	444 $\pm$ 56	70 $\pm$ 9	361 $\pm$ 45
Dunkelrotlicht	90 $\pm$ 9	571 $\pm$ 61	74 $\pm$ 8	338 $\pm$ 33
Dunkel	121 $\pm$ 15	803 $\pm$ 130	90 $\pm$ 8	356 $\pm$ 48

Die Proteinbestimmungen erfolgten an Geweben, die unter den jeweiligen Kulturbedingungen konstant bleibende Wachstumsraten erreicht hatten. Die angegebenen Proteinwerte sind Mittelwerte aus jeweils 10 Einzelbestimmungen.

Die Kinetinkonzentration betrug 10^{-6}g/ml .

TG = Trockengewicht, FG = Frischgewicht

Der Proteingehalt der Kalluskulturen, die im Dunkeln oder Blaulicht auf SD-Medium wuchsen, war mit 121 $\mu\text{g/mg TG}$ bzw. 800 μg bis 856 $\mu\text{g/100mg FG}$ identisch (Tab. 4, Spalte 1) und signifikant höher ($p < 0,0027$) als im Dunkelrotlicht (90 $\mu\text{g/mg TG}$; 571 $\mu\text{g/100mg/100mg FG}$) oder im Hellrotlicht mit 78 $\mu\text{g Protein/mg TG}$ bzw. 444 $\mu\text{g Protein/100mg FG}$.

Zwischen dem Proteingehalt der Hellrotlicht- und Dunkelrotlichtgewebe bestanden keine eindeutigen Unterschiede ($p = 0,01$).

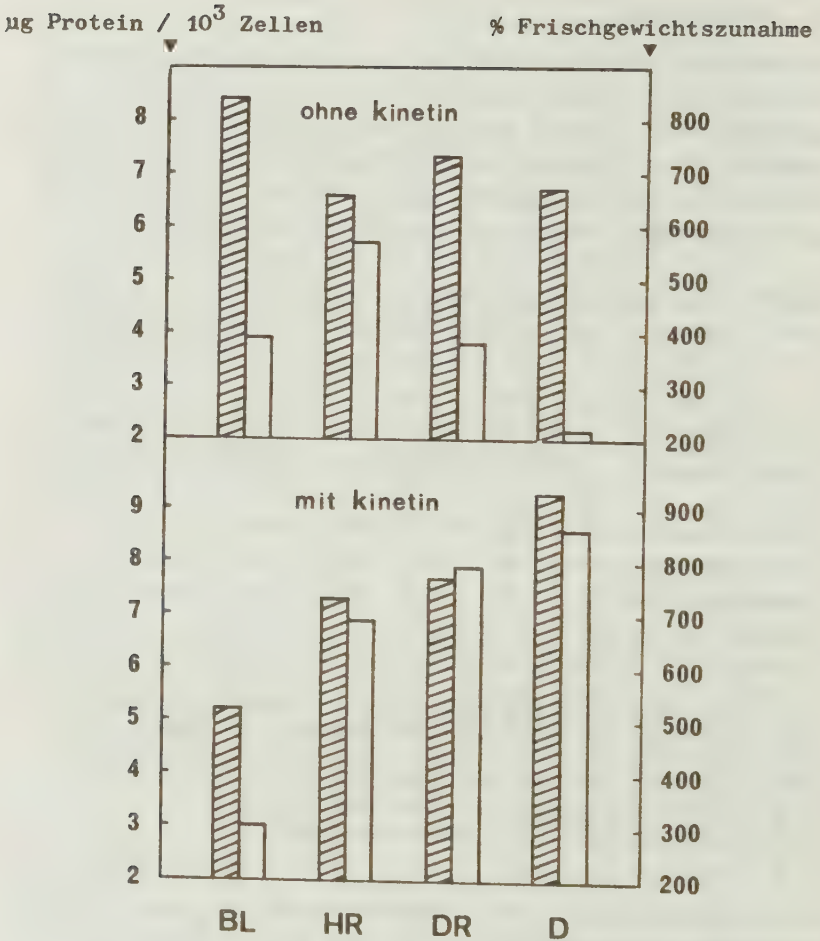


Abb. 6 Proteingehalt und Wachstumsintensität von Kalluszellen

auf SD-Medium ohne Kinetin sowie SD-Medium mit Kinetin 10^{-6} g/ml.

▨ Proteingehalt, □ % Frischgewichtszunahme.

BL = Blaulicht, HR = Hellrotlicht, DR = Dunkelrotlicht, D = Dunkel.

Zugabe von Kinetin (10^{-6} g/ml) führte, insbesondere bei den Dunkel- und Dunkelrotlichtgeweben, zur Verringerung des Proteingehalts pro Trockengewicht und Frischgewicht wie ein Vergleich mit den Proteinwerten der Kulturen auf SD-Medium zeigt (Tab. 4). In Gegenwart von Kinetin wurde der Proteingehalt der Dunkelkulturen um 25% bzw. 55% bezogen auf Trockengewicht oder Frischgewicht verringert, derjenige der Dunkelrotlichtgewebe um 18% bzw. 40%. In den Blaulicht- und Hellrotlichtkulturen betrug die Verringerung des Proteingehalts nach Zugabe von Kinetin ca. 10% bis 18%. Die Unterschiede waren mit Ausnahme der Hellrotlichtgewebe signifikant ($p < 0,0027$).

Der Proteingehalt der Kalluskulturen konnte kein eindeutiges Kriterium für die Wachstumsintensität der Gewebe sein, da z. B. die Kulturen mit hohen Frischgewichtszunahmen (Hellrotlichtgewebe auf SD-Medium oder Dunkelgewebe auf SD-Medium mit Kinetin) signifikant weniger Protein enthielten als die Kulturen mit geringeren Frischgewichtszunahmen (Blaulichtgewebe).

Wurde jedoch der Proteingehalt der Zellen berechnet, so veränderten sich die Werte, bedingt durch die unterschiedlichen Zellzahlen pro 100mg Frischgewicht, die die Kulturen unter den verschiedenen Lichtbedingungen hatten. Obwohl diese Angaben (Protein/Zelle) Durchschnittswerte darstellen, kann aus ihnen doch entnommen werden, ob der Proteingehalt in einer zur Wachstumsintensität vergleichbaren Relation steht. (Abb. 6). Bei Kalluszellen, die auf SD-Medium wuchsen, entsprach der Proteingehalt nicht der Wachstumsleistung, da die Zellen der Blaulichtkulturen mit $8,5 \mu\text{g}$ zwar bedeutend mehr Protein pro 10^4 Zellen enthielten als die Zellen der Hellrotlichtgewebe ($6,6 \mu\text{g Protein}/10^4$ Zellen) aber dennoch signifikant schlechter wuchsen als diese. Entsprechendes gilt für die Dunkelkulturen, die mit $6,7 \mu\text{g}$ Protein gleich viel

Protein enthielten wie die Hellrotlichtzellen aber bedeutend schlechter wuchsen. In Gegenwart von Kinetin war der Proteingehalt der Wachstumsintensität jedoch direkt proportional, d.h. die am schlechtesten wachsenden Blaulichtzellen enthielten auch am wenigsten Protein ($5,2 \mu\text{g}$ pro 10^4 Zellen). Wurde das Wachstum gefördert, so nahm auch der Proteingehalt der Zellen zu (im Hellrotlicht mit $7,3 \mu\text{g}$ und im Dunkelrotlicht mit $7,7 \mu\text{g}$ Protein pro 10^4 Zellen) und erreichte seinen maximalen Wert in den am besten wachsenden Zellen der Dunkelkulturen mit $9,4 \mu\text{g}$ Protein.

3. Intensität der Proteinsynthese

Die Intensität der Proteinsynthese ist einerseits ein direktes Maß für die Stoffwechselaktivität der Zellen und kann andererseits Aufschluß über die Intensität des Plasmawachstums der Zellen geben. Gemessen wurde die Proteinsynthese durch den Einbau von ^{14}C -Leucin in die Proteinfraction (Tab. 5). Hellrotlicht oder Kinetin förderten die Proteinsynthese. Die Einbaurate von ^{14}C -Leucin war im Hellrotlicht um 55% bis 80% höher als im Blaulicht, Dunkelrotlicht oder im Dunkeln bei Geweben, die auf SD-Medium wuchsen. (Tab. 5, Spalte 1). Kinetin erhöhte die Proteinsynthese im Dunkelrotlicht sowie im Dunkeln auf ungefähr die gleichen Werte wie im Hellrotlicht. Das entspricht einer Förderung von 70% bzw. 115% gegenüber den gleichen Kulturen ohne Kinetin (Tab. 5, Spalte 2). Dagegen blieb die Proteinsynthese im Blaulicht auch nach Applikation von Kinetin unverändert niedrig.

Diese Ergebnisse zeigen, daß die Intensität der Proteinsynthese die Wachstumsintensität der Kalluskulturen reflektiert. Eine Förderung der Frischgewichtszunahme war stets mit einer Erhöhung der Einbaurate von

^{14}C -Leucin verbunden (Hellrotlichtkulturen auf SD-Medium, Dunkelrotlicht- bzw. Dunkelkulturen auf SD-Medium mit Kinetin).

Tab. 5 Der Einfluß verschiedener Lichtqualitäten und Kinetin auf die Proteinsynthese in Kalluskulturen aus *Crepis capillaris*

Als Maß für die Intensität der Proteinsynthese wurde die spezifische Aktivität der Proteinfraction nach dem Einbau von ^{14}C -Leucin als Impulse/Minute/mg Protein (IpM/mg Protein) gewertet. Die angegebenen Daten sind Mittelwerte aus jeweils 5 Einzelbestimmungen.

Kulturbedingungen: SD-Medium; SD-Medium + Kinetin (10^{-6} g/ml)
Inkubation: 4 Tage; 1,25 uci ^{14}C -Leucin / Kultur.

Licht- bedingungen	IpM pro mg Protein	
	SD-Medium ohne Kinetin	SD-Medium mit Kinetin
Blaulicht	134.000 $\pm$ 16.000	122.000 $\pm$ 15.000
Hellrotlicht	225.000 $\pm$ 45.000	262.000 $\pm$ 45.000
Dunkelrotlicht	145.000 $\pm$ 16.000	246.000 $\pm$ 38.000
Dunkel	124.000 $\pm$ 30.000	268.000 $\pm$ 57.000

µg Chlorophyll/g Frischgewicht

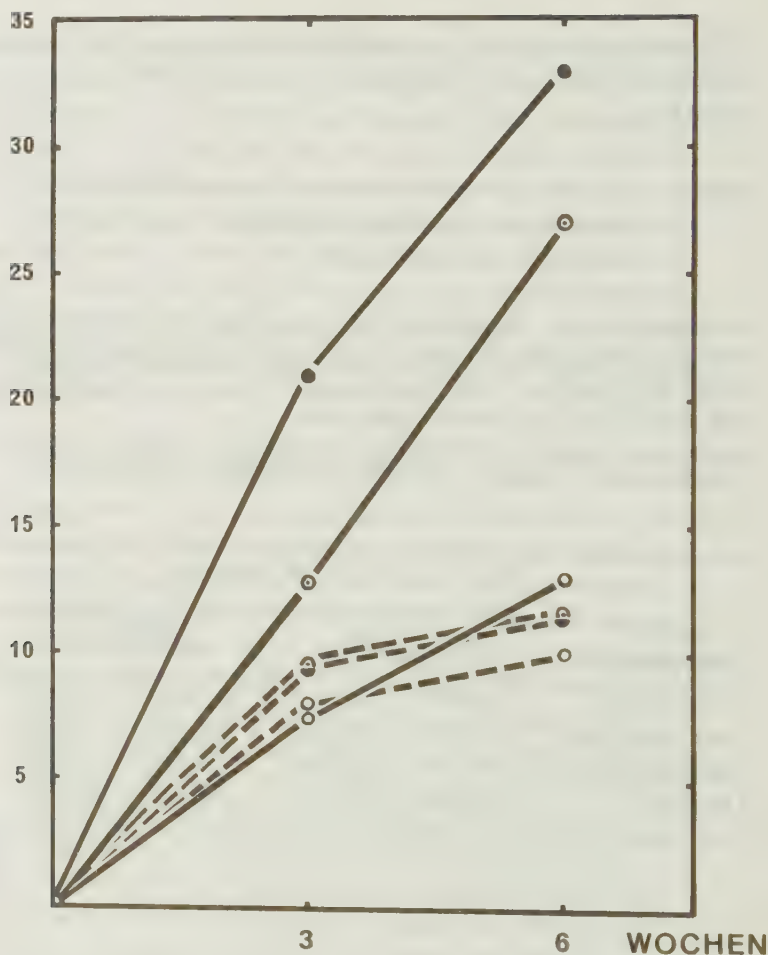


Abb. 7 Wiederinduktion der Chlorophyllsynthese in farblosen Kalluskulturen durch Blaulicht.

(—) ohne Kinetin, (---) mit Kinetin 10^{-6} g/ml
Kulturen aus dem Hellrotlicht (○), Dunkelrotlicht (◐),
Dunkeln (●).

Abszisse: Dauer der Blaulichtbestrahlung in Wochen.

Chlorophyllgehalt der Kulturen nach 30 Wochen Blaulicht auf SD-Medium ohne Kinetin 60 µg, auf SD-Medium mit Kinetin 24 µg Chlorophyll/g Frischgewicht.

III/1 Wiederinduktion der Chlorophyllsynthese in farblosen Kalluskulturen durch Blaulicht

Die folgenden Untersuchungen sollten die Frage klären, ob der Chlorophyllverlust der Zellen im Rotlicht oder im Dunkeln auf einer irreversiblen Veränderung in der stoffwechselphysiologischen Leistung beruht oder durch Bestrahlung mit Blaulicht die Chlorophyllsynthese in farblosen Geweben wiederinduziert werden kann. Es wurden Kalluskulturen, die seit mehr als 30 Wochen keine meßbaren Chlorophyllmengen mehr enthielten, 3 bzw. 6 Wochen mit Blaulicht bestrahlt. Sämtliche Gewebe bildeten im Blaulicht wieder Chlorophyll aus. Die Reaktion der Kalli zeigte dabei eine deutliche Abhängigkeit von der Vorbehandlung. Die stärkste Zunahme des Chlorophyllgehalts war bei Kalluskulturen zu beobachten, die im Dunkeln vor- kultiviert wurden ($33 \mu\text{g}$ Chlorophyll/g Frischgewicht). Die vor der Blaulichtbestrahlung im Dunkelrotlicht gehaltenen Gewebe scheinen Chlorophyll etwas verzögert zu synthetisieren. Die Differenz gegen die "Dunkelkulturen" ließ sich aber statistisch nicht absichern. Deutlich niedriger lag dagegen der Chlorophyllgehalt der "Rotlichtkulturen". Er betrug nach 6-wöchiger Blaulichtbestrahlung $13 \mu\text{g/g}$ Frischgewicht. Zugabe von Kinetin zum Medium führte bei den "Dunkel"- und "Dunkelrotlicht"-Kalli zu einer starken Reduktion des Chlorophyllgehalts. Nach 6-wöchiger Kultur im Blaulicht lag der Chlorophyllgehalt bei ca. $1/3$ des Wertes der Kontrollen ohne Kinetin. Diese Unterschiede waren signifikant ($p < 0,0027$). Kinetin beeinflusste dagegen das Verhalten der "Rotlicht"-Kalli nicht. Der Chlorophyllgehalt mit und ohne Kinetin war identisch und statistisch nicht abzusichern ($p = 0,1$).

Dagegen bestanden zwischen dem Gesamtchlorophyllgehalt bzw. der absoluten Menge neu synthetisierten Chlorophylls der verschieden vorbehandelten Kulturen nach 6-wöchiger Blaulichtbestrahlung keine signifikanten

Unterschiede. Die Werte lagen zwischen 22 bis 27 μg Chlorophyll bei einem durchschnittlichen Ausgangsgewicht der Kulturen von 300 mg.

Die teilweise signifikanten Unterschiede im Chlorophyllgehalt pro g Frischgewicht beruhten demnach auf einer "Chlorophyllverdünnung" in den Geweben, bedingt durch das verschieden starke Wachstum der unterschiedlich vorbehandelten Kulturen. In schnell wachsenden Geweben mit intensiver Zellteilung (Hellrotlichtgewebe auf SD-Medium, Hellrotlicht-, Dunkelrotlicht- oder Dunkelgewebe auf SD-Medium mit Kinetin) wurde die annähernd gleiche Chlorophyllmenge auf eine größere Anzahl von Zellen verteilt als in langsam wachsenden Kulturen (Dunkelrotlicht- oder Dunkelkulturen auf SD-Medium). Dadurch trat eine relative "Chlorophyllverdünnung" ein und diese Kulturen enthielten pro Gewichtseinheit Gewebe weniger Chlorophyll. Offensichtlich teilten sich in den schnell wachsenden Geweben die Zellen intensiver als die Chloroplasten sich vermehren konnten.

2. Veränderungen in der Wachstumsintensität

Wie in den vorangegangenen Untersuchungen nachgewiesen werden konnte, erreichten die Kalluskulturen aus *Crepis capillaris*, die seit mehr als 30 Wochen auf SD-Medium unter verschiedenen Lichtbedingungen wuchsen, sehr unterschiedliche aber konstant bleibende Wachstumsraten. In diesem Zusammenhang stellte sich die Frage, ob die deutlich differierenden Wachstumsleistungen der *Crepis*-Zellen lediglich auf einer Adaptation an die vorgegebenen verschiedenen Lichtbedingungen oder aber auf irreversiblen physiologischen Veränderungen der Zellen beruhen. Die folgenden Untersuchungen sollten außerdem darüber Aufschluß geben, ob die lichtabhängige Wachstumsförderung möglicherweise durch das Phytochromsystem gesteuert wird.

Frischgewichtszunahme in %

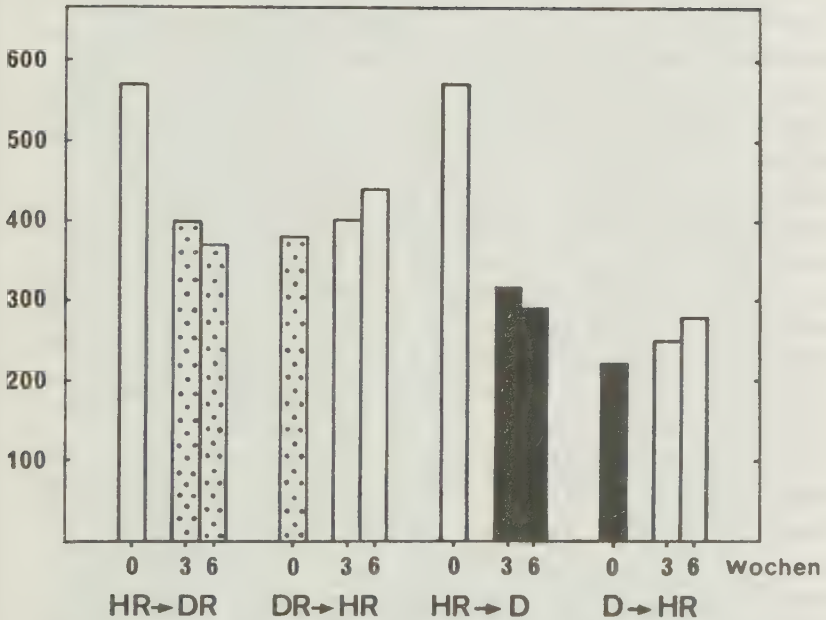


Abb. 8 Die Reaktion langfristig adaptierter Kallus-
kulturen auf veränderte Lichtbedingungen.

□ Hellrotlicht, ▤ Dunkelrotlicht, ■ Dunkel.

Abszisse: Kulturzeit in Wochen bei veränderten Lichtbedingungen.

0 Wochen: Frischgewichtszunahme der Kulturen auf SD-Medium vor Veränderung der Lichtbedingungen.

Aus diesem Grunde wurden wechselseitig verändert,

Hellrotlicht $\rightleftharpoons$ Dunkel

Hellrotlicht $\rightleftharpoons$ Dunkelrotlicht

Wechsel der Lichtqualitäten führte zu Veränderungen in der Wachstumsgeschwindigkeit der Kalluskulturen (Abb. 8). Hohe Wachstumsraten erforderten den kontinuierlichen Einfluß von Hellrotlicht. Denn Bestrahlung der Hellrotlichtgewebe mit Dunkelrotlicht oder Weiterkultur im Dunkeln führten bereits nach 6 Wochen zu signifikanten Wachstumshemmungen ($p < 0,0027$). Durch Bestrahlung mit Hellrotlicht wurde andererseits das Wachstum der Dunkelrotlicht- wie auch der Dunkelkulturen gefördert (Abb. 8). Jedoch nahm die Wachstumsförderung nur langsam zu, denn nach 6-wöchiger Hellrotlichtbestrahlung waren noch keine signifikanten Veränderungen in der Frischgewichtszunahme festzustellen. Aus diesem Grunde konnte auch der typische Phytochromeffekt bei Kurzzeitbestrahlung - die Reversibilität der Hellrot-Dunkelrot-Wirkung - nicht nachgewiesen werden. Damit ist gezeigt, daß sich die Crepis-Zellen auch im Verlaufe mehrmonatiger Subkultur nicht irreversibel verändert hatten, da die Wachstumsgeschwindigkeit der Kulturen durch einen Wechsel der Lichtbedingungen erneut verändert werden konnte. Da sich insbesondere die Steigerung der Wachstumsleistung der Kalluskulturen nach Bestrahlung mit Hellrotlicht erst im Verlaufe mehrerer Wochen deutlich manifestierte, lag offensichtlich eine langsam fortschreitende Anpassung der Zellen an die veränderten Lichtbedingungen vor.

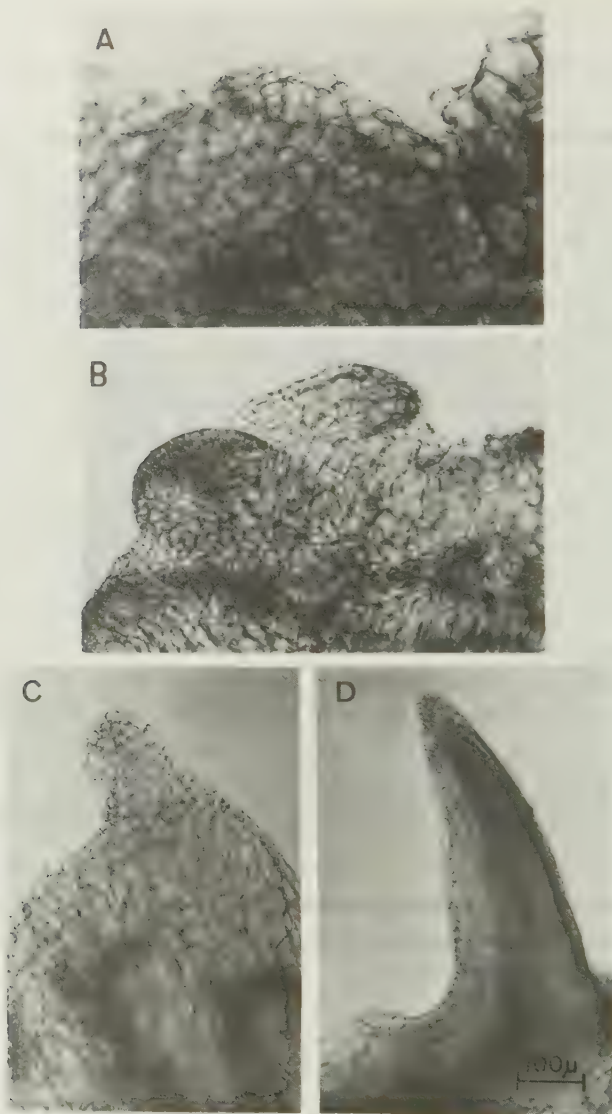
IV. Morphogenese

Die Crepis-Kulturen wuchsen seit 4 1/2 Jahren als undifferenzierte, chlorophyllhaltige Kalli. Bestrahlung mit verschiedenen Lichtqualitäten oder Applikation von Kinetin (10^{-6} g/ml) konnten keine Organbildung auslösen sondern veränderten lediglich die Wachstumsgeschwindigkeit der

Kulturen.

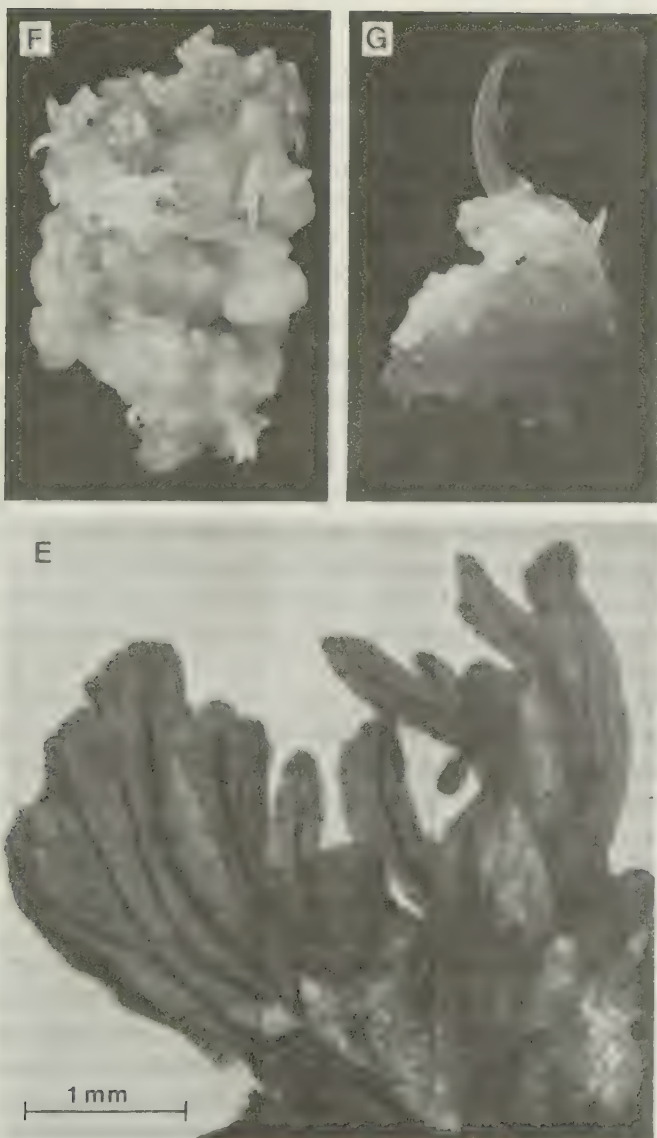
Induktion von Organbildungen ließ sich dagegen an chlorophyllhaltigen Kalluskulturen im Blaulicht durch Zugabe von Gibberellinsäure in einem Konzentrationsbereich von 10^{-6} , 10^{-8} und 10^{-9} g/ml erreichen. Nach 3-wöchiger Subkultur auf Gibberellin-haltigem Medium hatten 20%, nach 6 Wochen 50% der Crepis-Kulturen im Blaulicht Blätter bzw. Sprosse regeneriert. Unter dem Einfluß von Gibberellin bildeten sich aus den unorganisiert wachsenden Kalluszellen im Blaulicht regulär angeordnete Gewebezonen, ähnlich der Epidermis bzw. Tunica in jungen meristematischen Pflanzenteilen (Tafel II, A - C). Diese exogenen Meristeme wuchsen zu Sproß- bzw. Blattanlagen aus, vergleichbar den Blattprimordien an intakten Pflanzen (Tafel II, B und C). Das Sproß- oder Blattmeristem wurde monopolar, d.h. ohne gleichzeitige Ausbildung eines Wurzelmeristems angelegt. Die weitere Entwicklung führte zur Ausbildung von Blättern (E, F und G), an denen die begrenzende Zellschicht des Protoderms bzw. der späteren Epidermis sowie die Leitbündelanordnung deutlich zu erkennen waren. Die Leitbündel endeten jedoch blind im unorganisiert wachsenden Kallus, da keine Wurzeln angelegt wurden.

Im Rotlicht oder im Dunkeln kam es niemals zur Blattbildung, sondern die Kulturen waren unkorreliert wachsende Kalli.



Tafel II Induktion von Regeneraten an 4 1/2 Jahre
 alten Kalluskulturen aus *Crepis capillaris*
durch Zusammenwirken von Blaulicht und Gibberellin.

Die Kontrollkulturen im Blaulicht ohne Gibberellin wachsen ungeordnet und bilden keine Regenerate (A). Nach Zugabe



von Gibberellin 10^{-6} , 10^{-8} oder 10^{-9} g/ml bilden sich exogen Sproßmeristeme bzw. Blattprimordien aus (B und C), die zu Blättern auswachsen (D und E). (F) ganze Kalluskultur und (G) Teil einer Kultur, die 6 Wochen unter induktiven Bedingungen gewachsen sind. Die Handschnitte (A - D) und das Quetschpräparat (E) stammen von Kulturen, die in 4%-igem Formalin fixiert wurden.

DISKUSSION

Mit den vorliegenden Ergebnissen ist gezeigt worden, daß das Wachstum der Kalluskulturen aus *Crepis capillaris* durch 3 Faktoren - Licht, Kinetin oder Stickstoff - entscheidend beeinflußt werden kann.

Wie bereits in früheren Untersuchungen nachgewiesen wurde, erreichen die Kalluskulturen auf SD-Medium in Gegenwart eines Albuminhydrolysats im Dunkeln oder im Rotlicht die absolut höchsten Frischgewichtszunahmen (HÜSEMANN 1970). Dagegen wird das Wachstum im Dunkeln gehemmt und generell durch Licht, insbesondere durch Hellrotlicht, gefördert, wenn der Aminosäurestickstoff des Albuminhydrolysats durch äquivalente Mengen Glutaminsäure ersetzt wird. Obwohl Glutaminsäure im allgemeinen schnell metabolisiert wird und als NH_2 -Gruppen-Donator am Aufbau anderer Aminosäuren beteiligt ist, kann sie die wachstumsfördernde Wirkung des Albuminhydrolysats nicht ersetzen. Die *Crepis*-Kulturen sind offensichtlich nicht in der Lage, bestimmte essentielle Aminosäuren in ausreichendem Maße zu synthetisieren. Ähnlich verhalten sich Kalluskulturen aus Zuckerrohr, die insbesondere auf eine exogene Versorgung mit Arginin angewiesen sind (MARETZKI und NICKELL 1969).

Die vorliegenden Ergebnisse haben gezeigt, daß Hellrotlicht das Wachstum der Kulturen ebenso intensiv fördert wie das im Albuminhydrolysat enthaltene Aminosäuregemisch. Licht und Aminosäuren zeigen zwar ähnliche physiologische Wirkungen, indem sie das Wachstum fördern, doch muß die Frage offen bleiben, über welche Reaktionsmechanismen beide "Faktoren" ihre wachstumsfördernde Wirkung realisieren.

Die lange, ca. 27 Wochen dauernde Adaptationsphase, die die *Crepis*-Kulturen benötigen, um konstant bleibende Wachstumsraten nach Übertragung aus dem Weißlicht in

Hellrotlicht zu erreichen, deutet darauf hin, daß sich die physiologischen Eigenschaften der Zellen stark verändern. STREET (1966) weist darauf hin, daß Adaptationen von Gewebekulturen an veränderte Kulturbedingungen, die die physiologischen Eigenschaften der Zellen stark verändern, bevor sie ein "Steady-state" im Stoffwechsel und Wachstum erreichen, sich häufig über einen langen Zeitraum erstrecken. So beträgt die Wachstumsrate kultivierter Wurzeln von Sonnenblumen erst nach 15 Wochen Kulturzeit 200% der Durchschnittswerte der Zunahme aus den ersten 5 Wochen. Die durch Hellrotlicht induzierte Wachstumsförderung der Crepis-Kulturen ist sowohl mit einer Steigerung der Proteinsynthese als auch mit einer deutlichen Veränderung des Zell- bzw. Gewebetyps in physiologischer und in anatomisch-cytologischer Hinsicht verbunden. Das zeigt sich insbesondere durch den Chlorophyllverlust und durch das starke Streckungswachstum der Zellen.

Als ein wesentliches Wachstumskriterium wird im allgemeinen der Proteingehalt bzw. die Proteinsynthese der Zellen angesehen, da beide in direkter Beziehung zum Plasmawachstum der Zellen stehen. Die Untersuchungen an Crepis-Kulturen führten, was den absoluten Proteingehalt der Gewebe betrifft, zu teilweise widersprüchlichen Ergebnissen und zeigen, daß zwischen dem absoluten Proteingehalt der Kulturen und der eigentlichen Proteinsynthese als Kriterien der Wachstumsleistung unterschieden werden muß. So haben die am schnellsten wachsenden Kulturen auf SD-Medium im Hellrotlicht signifikant weniger Protein als die sehr viel schlechter wachsenden Gewebe im Blaulicht oder im Dunkeln. Der absolute Proteingehalt reflektiert also nicht die tatsächliche Wachstumsleistung der Kulturen. Der hohe Proteingehalt der Blaulicht- oder Dunkelgewebe kann eine Folge des geringen Zellteilungs- und Zellstreckungswachstums sein, so daß sich die Proteine akkumulieren und nicht wie in den schnell wachsen-

den Kulturen auf eine größere Anzahl von Zellen verteilt werden.

Dagegen verändert Kinetin sowohl die Wachstumsintensität als auch den Proteingehalt bzw. die Proteinsynthese der Kalluskulturen sehr stark. Nach Applikation von Kinetin werden ursprünglich vorhandene Wachstumshemmungen im Dunkeln sowie Dunkelrotlicht aufgehoben und in signifikante Wachstumsförderungen umgekehrt. Die Frischgewichtszunahme der Kalluskulturen wird im Dunkeln von 220% auf 860%, im Dunkelrotlicht von 380% auf 790% erhöht. Diese enorme Wachstumsförderung umfaßt sowohl eine starke Steigerung des Streckungswachstums als auch eine Erhöhung der Teilungsintensität der Kalluszellen. Obwohl Kinetin das Wachstum fördert, wird der Proteingehalt pro mg Trockensubstanz bzw. 100 mg Frischgewicht deutlich reduziert, im Dunkeln um 25% bzw. 35%, im Dunkelrotlicht um 18% bzw. 40%. Dies scheint zunächst ein Widerspruch zu sein. Wahrscheinlich steht aber nur ein kleiner Teil des Gesamtproteins der Zellen, insbesondere Enzymproteine, mit der Wachstumsleistung in unmittelbarem Zusammenhang, so daß der absolute Proteingehalt auf ein bestimmtes Maß reduziert werden kann, ohne daß sich die Wachstumsgeschwindigkeit verändert. Für diese Annahme sprechen auch Inhibitorversuche an isolierten Hypokotylsegmenten von Sojabohnen (KEY und INGLE 1964). Die Autoren haben nachgewiesen, daß sowohl für das endogene als auch für das auxin-induzierte Längenwachstum der Hypokotylsegmente zwar eine beständige RNS- und Proteinsynthese erforderlich ist, doch kann die Gesamt-RNS-Synthese durch Actinomycin D oder 5-Fluorouracil zu 50% gehemmt werden, ohne daß das Wachstum beeinträchtigt wird.

Betrachtet man jedoch den Proteingehalt der Kalluszellen, die auf SD-Medium mit Kinetin kultiviert werden, so zeigt sich, daß mit zunehmender Wachstumsleistung der Gewebe auch der Proteingehalt der Zellen erhöht wird, und zwar von 5,2 µg Protein im Blaulicht bei Frischgewichtszunahmen von 300% auf 9,4 µg Protein im Dunkeln bei Frischgewichtszunahmen von 860%. Kinetin korreliert also ganz offensichtlich

lich den Proteingehalt der Zellen mit der Wachstumsleistung.

Wie die Versuche über den Einbau von ^{14}C -Leucin in die Proteinfraktion gezeigt haben, stimuliert Kinetin die Proteinsynthese, die ein wesentliches Kriterium des Plasmawachstums der Zellen ist und schafft damit eine Grundvoraussetzung für das intensive Wachstum der Kalluskulturen. Die Proteinsynthese reflektiert in allen Fällen weitgehend die Wachstumsintensität der Crepis-Kulturen. Insbesondere durch Kinetin aber auch durch Hellrotlicht wird die Einbaurate von ^{14}C -Leucin auf ungefähr das Doppelte im Vergleich zu den Kontrollkulturen gesteigert. Das erhöhte Angebot an Proteinen wird in eine deutliche Förderung des Zellteilungs- und Zellstreckungswachstums umgesetzt.

Die Wirkung des Kinetins auf das Wachstum der Crepis-Kulturen entspricht - in bezug auf die Förderung der Zellteilung - den Ergebnissen von DAS et al. (1956), MURASHIGE und SKOOG (1962) sowie MILLER (1963), nach denen Cytokinine im Zusammenwirken mit Auxinen insbesondere die Zellteilung in Kalluskulturen beträchtlich fördern können. Die auffälligste physiologische Wirkung des Kinetins an Crepis-Kulturen zeigt sich jedoch in der starken Förderung des Streckungswachstums der Zellen. Obwohl Cytokinine im allgemeinen als Zellteilungshormone definiert werden, gibt es doch zahlreiche Beispiele, in denen Kinetin hauptsächlich die Zellstreckung fördert (SCOTT und LIVERMANN 1956, POWELL und GRIFFITH 1960, 1962). Es stellt sich jedoch die Frage, ob das enorme Streckungswachstum der Crepis-Zellen eine spezifische Wirkung des Kinetins ist oder ob Kinetin die Sensibilität der Zellen auf Auxine erhöht, womit die Zellstreckung letzten Endes auf eine Auxinwirkung zurückzuführen wäre. So haben WITHAM (1968) und auch SIMPKINS und STREET (1970) in Untersuchungen zeigen können, daß Kinetin den optimalen Auxinbedarf von Kalluskulturen herabsetzt. Sie leiten aus diesen Beobachtungen ab, daß

Kinetin entweder die Sensibilität der Zellen auf Auxinen herabsetzt oder aber möglicherweise die endogene Auxinsynthese in den Geweben steigert.

Bemerkenswert ist, daß Kinetin das Wachstum der Crepis-Kulturen nur im Dunkeln oder Rotlicht, aber nicht im Blaulicht fördern kann. Nach Applikation wird das Wachstum der chlorophyllhaltigen Blaulichtkulturen signifikant gehemmt. Die damit verbundenen Veränderungen des Zell- bzw. Gewebetyps wie Hemmung des Streckungswachstums und Ausbildung von Chloroplasten weisen Parallelen zur Verhinderung des Etiolelements an Pflanzen auf. Das entspricht den Ergebnissen von BJÖRN et al. (1963) sowie OHNO und FUJIWARA (1967) an isolierten Weizen- bzw. Reiswurzeln. Blaulicht hemmte im Vergleich zum Rotlicht oder Dunkeln das Längenwachstums der Wurzeln, förderte jedoch die Chlorophyllsynthese. Aber auch auf chlorophyllfreies Gewebe kann Licht wachstumshemmend wirken (POLEVAYA 1967). So werden in farblosen Kalluskulturen aus Karotten Zellteilung und Zellstreckung im Blaulicht stärker gehemmt als im Rotlicht oder im Dunkeln.

Wie die vorliegenden Untersuchungen gezeigt haben, induzieren Hellrotlicht oder Kinetin an den Crepis-Kulturen ähnliche physiologische Veränderungen, nämlich die Förderung der Zellteilung, Zellstreckung und der Proteinsynthese. Es ist bekannt, daß die physiologische Wirkung von Hellrotlicht bei der Samenkeimung oder bei dem Blattflächenwachstum durch Phytohormone wie Gibberellin oder Kinetin ersetzt werden kann und daß nachfolgende Bestrahlung mit Dunkelrotlicht die Phytohormonwirkung nicht blockiert (MILLER 1956, SCOTT und LIVERMANN 1956, POWELL und GRIFFITH 1960 sowie IKUMA und THIMAN 1960). Im Prinzip ähnlich ist der Einfluß von Kinetin auf das Wachstum der Crepis-Kulturen. Hellrotlicht oder Kinetin können sich gegenseitig ersetzen, wobei jedoch das Phytohormon

erheblich wirksamer ist und auch durch Dunkelrotlichtbestrahlung nicht blockiert wird. In Verbindung mit den Ergebnissen, daß Albuminhydrolysat das Wachstum ähnlich wie Kinetin oder Hellrotlicht fördert, stellt sich die Frage, ob der ähnlichen physiologischen Wirkung auch ein vergleichbarer Wirkungsmechanismus zugrunde liegt. Der wachstumsfördernde Effekt des Albuminhydrolysats könnte, außer auf dem optimalen Angebot an Aminosäuren zur Proteinsynthese auch auf einer Erhöhung der Cytokininproduktion in den Kalluszellen beruhen. Es ist bekannt, daß die Cytokininsynthese in Pflanzen durch Erhöhung des Stickstoffangebots gesteigert werden kann (WAGNER und MICHAEL 1971). Der Hellrotlichteffekt könnte ebenfalls über eine Steigerung der Synthese wachstumsfördernder Substanzen zustande kommen. In den letzten Jahren ist von verschiedenen Seiten über die Bildung von Phytohormonen - insbesondere Gibberellinen - in pflanzlichen Geweben nach der Bestrahlung mit Hellrotlicht berichtet worden. Dabei hat sich gezeigt, daß der Gehalt an Phytohormonen bei nachfolgender Dunkelkultur sehr schnell verringert wird. (REID et al. 1967, KÖHLER 1966, BEEVERS et al. 1970). Es ist also nicht auszuschließen, daß die Wachstumsförderung der Kalluskulturen im Hellrotlicht auf einem vermehrten Angebot an wachstumsfördernden Substanzen mit Cytokininaktivität beruht. Falls diese Deutung zutrifft, würde das geringere Wachstum der Kulturen im Dunkeln oder Dunkelrotlicht durch die Menge an Phytohormonen limitiert. Für diese Möglichkeit sprechen die Beobachtungen, daß hohe Wachstumsraten die kontinuierliche Bestrahlung mit Hellrotlicht erfordern. Übertragung der Kalluskulturen aus dem Hellrotlicht ins Dunkel oder Dunkelrotlicht führt bereits nach 6 Wochen zu signifikanten Wachstumshemmungen. Ähnlich verhalten sich heterotrophe Kulturen von *Lemna minor*. Bei Dunkelkultur kann die Sproßvermehrungsrate auf das 10-fache gesteigert werden, wenn die Pflanzen in bestimmten Zeitabständen

mit Hellrotlicht bestrahlt werden. Auch in diesem Fall kann Kinetin oder Albuminhydrolysat die Wirkung des Hellrotlichts ersetzen (HILLMANN 1957, FORHAM 1950).

Andererseits wird die Frischgewichtszunahme der Dunkel- oder Dunkelrotlichtkulturen aus *Crepis* auch nach 6-wöchiger Bestrahlung mit Hellrotlicht noch nicht eindeutig erhöht. Offensichtlich sind die durch Hellrot induzierten physiologischen Veränderungen sehr komplex, so daß die Gewebe langfristig adaptiv reagieren (STREET 1966), da nicht nur der Stoffwechsel (Proteinsynthese) sondern ebenfalls der Zell- bzw. Gewebetyp verändert werden. Es ist insbesondere daran zu denken, daß mit einer Stimulierung des Streckungswachstums der Zellen auch Veränderungen in den Membran- und Wandeigenschaften verbunden sind.

Es ist andererseits jedoch durchaus möglich, daß Hellrotlicht direkt an den Stellen angreift, an denen auch das Kinetin wirksam wird. Möglicherweise auf der Ebene des Nukleinsäure- oder Proteinstoffwechsels, z. B. durch die Bildung essentieller Enzyme. FEIERABEND (1969) hat nachweisen können, daß die Synthese zahlreicher Enzyme in etiolierten Roggenkeimlingen sowohl durch das Phytohormon Kinetin als auch durch das Phytochromsystem reguliert wird, wobei aber Kinetin und Phytochrom über verschiedene Reaktionswege wirken. In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, über welchen Photorezeptor Rotlicht in den Kalluszellen wirksam wird. Die für das Phytochromsystem bei Kurzzeitbestrahlung charakteristische Reversibilität der Hellrot- und Dunkelrotwirkungen kann an den *Crepis*-Kulturen nicht nachgewiesen werden, da das komplexe System "Wachstum" als Reaktionsgröße nur durch Dauerlichtbestrahlung (Hochenergiereaktion) beeinflußt werden kann. Sollte dennoch Phytochrom als Photorezeptor für das lichtgesteuerte Wachstum verantwortlich sein, so bestünden Diskrepanzen zwischen der Wirkung von Dauerhellrot und Dauerdunkelrot. HARTMANN (1966, 1967) nimmt an, daß bei

Langzeitbestrahlung über die Hochenergiereaktion im Dunkelrot eine zwar niedrige aber physiologisch sehr effektive Konzentration an P_{730} eingestellt wird, während im Dauerhellrotlicht die Konzentration an P_{730} sehr stark reduziert wird (MOHR 1969). Da jedoch Dauerhellrotlicht das Wachstum der Kalluskulturen optimal fördert, dürfte keine Destruktion von P_{730} einsetzen. Es müßte vielmehr in den wachsenden Geweben eine ständige Neusynthese von P_{730} ablaufen. Die Untersuchungen von CLARKSON und HILLMAN (1967, 1968) haben gezeigt, daß in pflanzlichen Geweben auch im Dauerhellrot konstante Phytochrommengen vorhanden sind. Desgleichen berichten ENGELSMA (1967) und JAFFE und ISENBERG (1969) über physiologisch wirksames Dauerhellrotlicht bei der Induktion der Phenyl-alanin-ammonium-lyase in Gurkenkeimlingen sowie bei der Synthese von Ligninverbindungen in Kartoffelgeweben.

Es wird das Ziel weiterer Untersuchungen sein festzustellen, ob Phytochrom als wirksamer Photorezeptor an der rotlichtabhängigen Wachstumsförderung der Kalluskulturen aus *Crepis capillaris* beteiligt ist.

Interessant ist die Wirkung von Kinetin an chlorophyllhaltigen Kalluskulturen im Blaulicht. Die gleiche Kinetinkonzentration (10^{-6} g/ml), die das Wachstum der Kulturen im Rotlicht oder Dunkeln fördert und sich somit als physiologisch günstig erweist, führt im Blaulicht zu einer deutlichen Wachstums hemmung. Aus diesem Grunde kann die applizierte Kinetinmenge an sich noch keine überoptimale Konzentration sein. Ausschlaggebend dürften vielmehr die durch Blaulicht induzierten Veränderungen in den physiologischen Eigenschaften der Zellen sein. So könnte das Phytohormon nach zusätzlicher Applikation von Kinetin in überoptimalen Konzentrationen vorliegen, wenn die chlorophyllhaltigen Kalluskulturen im Blaulicht zur Synthese nativer Cytokinine fähig wären. Möglicherweise ist aber auch das Konzentrationsverhältnis von Auxinen zu Cytokinin

für das Wachstum der Crepis-Kulturen entscheidend. Es ist bekannt, daß Kinetin-induzierte Wachstumsförderungen in Wachstumshemmungen umschlagen können, wenn das Phytohormon in überoptimalen Konzentrationen appliziert wird. So kann das Wachstum von Kalluskulturen aus Tabak in Gegenwart von Auxin durch Kinetinkonzentrationen von 10^{-10} M bis 10^{-6} M gefördert werden; aber eine geringfügige Erhöhung der Kinetinmenge von 10^{-6} M auf $2,5 \times 10^{-6}$ M führt bereits zu fast vollständiger Wachstumshemmung (NUDEL und BAMBERGER 1970). Andererseits kann durch hohe Kinetinkonzentrationen das physiologisch günstige Verhältnis von Auxinen zu Cytokinen gestört werden, wodurch es zu drastischen Wachstumshemmungen kommt. So wird der optimale Auxinbedarf von Tabak- oder Sojabohnenkallus nach Applikation von Kinetin von ursprünglich 5 mg/l auf 0,5 mg/l reduziert. Höhere Auxinkonzentrationen als 0,5 mg/l führen in Gegenwart von Kinetin zur Wachstumshemmung (WITHAM 1968). Wie sehr der Stoffwechsel von Kalluszellen durch überoptimale Kinetinkonzentrationen verändert wird, haben SIMPKINS und STREET (1970) nachgewiesen. Die Autoren fanden, daß hohe Kinetinkonzentrationen sowohl die Atmung als auch die Proteinsynthese blockieren, insbesondere die Aktivität von Enzymen des Kohlenhydratstoffwechsels.

Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob die chlorophyllhaltigen Kalluskulturen im Blaulicht tatsächlich Cytokine bilden. In diesem Zusammenhang wäre es interessant zu überprüfen, ob durch Applikation von kinetin-Analogen wie Adenin, ^6N -Methylaminopurin oder 1-Methyl-6-benzyladenin, die selbst wenig Cytokininaktivität besitzen, die Wachstumshemmung im Blaulicht teilweise aufgehoben werden kann. Die Kinetin-analogen Verbindungen werden auf Grund ihrer ähnlichen Struktur an Stelle des Kinetins von der Zelle in den Stoffwechsel aufgenommen und können dadurch zu kompetitiven Hemmungen führen und die eigentliche Kinetinaktivität herabsetzen.

Kalluskulturen aus *Crepis capillaris* regenerieren vor allem kurz nach der Isolierung Sprosse und Wurzeln. Dieses Entwicklungsmuster läßt sich durch Zusatz von Auxin und Kinetin modifizieren. Mit zunehmender Kulturdauer nimmt jedoch das Regenerationsvermögen ab und nach ca. 6-monatiger Subkultur auf SD-Medium wachsen die *Crepis*-Kulturen in der Regel als unorganisierter Kallus (REINERT und KÜSTER 1966, HÜSEMANN 1970). Damit stellt sich die Frage, ob nach einer gewissen Zeit *in vitro* irreversibel die Totipotenz der Zellen verloren geht oder ob der Verlust der Regenerationsfähigkeit auf einer reversiblen Änderung bestimmter Kompetenzen der Kalluszellen beruht.

Wie die vorliegenden Untersuchungen zeigen, ist es jedoch durch geeignete Bedingungen wie die kombinierte Wirkung von Blaulicht und Gibberellin möglich, auch an *Crepis*-Kulturen, die seit 4 Jahren als unorganisierte Kalli wuchsen, die Regeneratbildung erneut auszulösen. Die Kalluszellen haben also die Kompetenz zur Organbildung nicht verloren und auch die genetische Information der Zellen hat sich nicht verändert sondern ist nur schwieriger zu realisieren. Es liegt also nahe, daß bei einem Erlöschen der Regenerationsfähigkeit "die Kulturbedingungen und andere nicht-genetische Faktoren die Manifestierung genetischer Information verhindern" (REINERT 1968). Zwei Faktoren müssen zusammenwirken, um die Morphogenese auszulösen. Denn erst die Applikation von Gibberellin induziert in den chlorophyllhaltigen Kalluskulturen im Blaulicht die Regeneratbildung.

Es ist bekannt, daß Blaulicht die Photomorphogenese der Pflanzen steuert. So induziert Blaulicht die Ausbildung von Chloroplasten (BJÖRN 1963, BERGMANN und BERGER 1966) und steuert die Entwicklung der Farnprothallien vom fädigen Protonema zum Prothallium (MILLER und MILLER 1961). WEISS und JAFFE (1969) ist es gelungen, durch Blaulicht die Regeneration von Sprossen in Tabakkulturen zu indu-

zieren, während in Untersuchungen von BEAUCHESNE et al. (1966) die Organbildung im Blaulicht auf der Stufe der "nodules" - gemeint sind meristematische Zellkomplexe - stehen blieb. Im Unterschied dazu erfordert die Organbildung in Kalluskulturen aus *Crepis capillaris* die kombinierte Wirkung von Blaulicht und Gibberellin, wobei das Phytohormon in einem weiten Konzentrationsbereich von 10^{-9} bis 10^{-6} g/ml wirksam ist. Unter Rotlicht- oder Dunkelbedingungen ist Gibberellin unwirksam.

Dieser Gibberellin-Effekt an *Crepis*-Kulturen ist insofern interessant, als zahlreiche Untersuchungen vorliegen, in denen Gibberellin die Organbildung hemmt (SCHRAUDOLF und REINERT 1959, MURASHIGE 1964, REINERT und BESEMER 1967). In *Crepis*-Kulturen entwickeln sich die Gibberellin-induzierten Regenerate exogen in den äußersten Zellschichten des Kallus. Die bisherigen Ergebnisse lassen vermuten, daß Gibberellin im Zusammenwirken mit Blaulicht durch Auslösung antikliner und perikliner Teilungen in dem zunächst ungeordneten Zellkomplex des Kallus die Bildung sekundärer Meristemzonen induziert. Die Weiterentwicklung führt dann über die Anlage von Primordien zur Ausbildung von Blättern.

Abschließend soll noch der spezifische Blaulichteffekt auf die Chlorophyllbildung in den Kalluszellen von *Crepis* betrachtet werden. Im allgemeinen können Chlorophyllsynthese und Differenzierung von Proplastiden zu Chloroplasten in intakten Pflanzen sowohl durch Blaulicht als auch durch Hellrotlicht ausgelöst werden. In manchen Fällen ist jedoch Blaulicht wirksamer als Rotlicht (VLASOVA et al. 1971). In isolierten Pflanzenteilen dagegen werden Chlorophyllsynthese und Chloroplastenentwicklung häufig nur durch den blauen Anteil des Lichtes ermöglicht. So können isolierte Wurzeln von *Triticum vulgare*,

Cucumis sativus oder *Pisum sativum* nur im Blaulicht Chlorophyll synthetisieren (BJÖRN 1965, 1966). Die Granastruktur von Chloroplasten aus isolierten Blättern wird im Rotlicht schneller abgebaut als im Blaulicht (VOSKRESENSKAYA et al. 1968). Kalluskulturen verhalten sich ähnlich wie isolierte Pflanzenteile, denn in Tabakkulturen finden Chlorophyllsynthese und Chloroplastenentwicklung ebenfalls nur im Blaulicht statt (BERGMANN und BERGER 1966). An den *Crepis*-Kulturen ist bisher jedoch nur die blaulichtabhängige Chlorophyllbildung untersucht worden. Elektronenmikroskopische Untersuchungen müssen zeigen, inwieweit die Feinstruktur der Chloroplasten durch Hellrotlichtbestrahlung verändert wird und ob der Chlorophyllverlust der *Crepis*-Zellen direkt mit dem Abbau der Granastruktur verbunden ist, wie SCHÜRMANN (1967) an Hochblättern von *Davidia* und VSORKESKENSAYA et al. (1968) an Gerstenblättern nachgewiesen haben.

Auffallend ist, daß Kinetin den Chlorophyllgehalt der Kalluskulturen im Blaulicht deutlich verringert. Es gibt bisher nur wenige Befunde über einen "negativen" Kinetineffekt auf die Chlorophyllsynthese. So kann Kinetin den Chlorophyllabbau in isolierten Kartoffelblättern beschleunigen (BRUISMA 1966) und die Chlorophyllbildung in *Cucumis*-Cotyledonen hemmen (NARAIN und LALORAYA 1970). Im allgemeinen jedoch fördert Kinetin die Chlorophyllsynthese bzw. hemmt den Chlorophyllabbau, indem es die Alterung der Blätter verzögert (RICHMOND und LANG 1957, MOTHES 1960, BANERJI und LALORAYA 1967).

Möglicherweise ist die Hemmung der Chlorophyllsynthese in *Crepis*-Kulturen eine direkte Folge verringerter Stoffwechselaktivität der Zellen, da durch Kinetin ebenfalls das Wachstum der Kalluskulturen im Blaulicht gehemmt wird. Die Ergebnisse an den *Crepis*-Kulturen entsprechen den Untersuchungen von KAUL und SABHARWAL (1971) an Tabakkulturen sowie von ERISMANN und WEGNER (1967) an Kulturen von

Lemna minor, daß durch Kinetinkonzentrationen, die das Wachstum hemmen, ebenfalls die Chlorophyllsynthese reduziert wird. Die in den vorliegenden Versuchen applizierte Konzentration (10^{-6} g/ml) kann an sich noch keine überoptimale Konzentration sein, da die gleiche Menge des Phytohormons im Dunkeln oder Rotlicht das Wachstum der Kalluskulturen fördert. Die beobachtete Hemmung könnte jedoch aus zu hohen Kinetinkonzentrationen resultieren, wenn die *Crepis*-Zellen im Blaulicht native Cytokinine synthetisieren oder aber das exogen applizierte Kinetin nicht schnell genug umsetzen. Dadurch könnte es schließlich zu einer Akkumulation und in Folge dessen zu überoptimalen Kinetinkonzentrationen in den Zellen kommen, die ihrerseits den Stoffwechsel und das Wachstum erheblich beeinträchtigen (SIMPKINS und STREET 1970).

ZUSAMMENFASSUNG

Das Wachstum von Kalluskulturen aus *Crepis capillaris* auf SD-Medium wird im Licht gefördert, wobei die einzelnen Spektralbereiche unterschiedlich wirken. Im Hellrotlicht (660 nm) erreichen die chlorophyllfreien Kulturen die höchsten Wachstumsraten, während die Frischgewichtszunahme der Gewebe im Dunkeln eindeutig gehemmt wird. Das Wachstum der Kalluskulturen im Dunkelrotlicht (730 nm) oder im Blaulicht (410 nm) ist nahezu identisch, Hemmung gegenüber Hellrotlicht, Förderung im Vergleich zum Dunkeln.

Zugabe von Kinetin (10^{-6} g/ml) verändert den Einfluß des Lichtes auf das Wachstum der *Crepis*-Kulturen. Ursprünglich vorhandene Wachstumshemmungen im Dunkeln oder Dunkelrotlicht werden aufgehoben und in signifikante Wachstumsförderungen umgekehrt. Dagegen wird die Frischgewichtszunahme der chlorophyllhaltigen Kulturen im Blaulicht nach Applikation von Kinetin eindeutig gehemmt.

Die Wachstumsförderungen der Kalluskulturen durch Hellrotlicht oder Kinetin sind mit einer Erhöhung der Proteinsynthese sowie mit einer Steigerung der Zellteilungsintensität und des Streckungswachstums verbunden. Kinetin ist sehr viel wirksamer als Hellrotlicht, das gilt besonders für die Förderung des Streckungswachstums der Zellen.

Kinetin fördert und korreliert die Proteinsynthese mit dem Zellwachstum, denn der Proteingehalt der Kalluszellen, die auf SD-Medium mit Kinetin wachsen, wird in annähernd gleichem Maße erhöht wie die Wachstumsgeschwindigkeit der Gewebe. Entsprechendes gilt für die Intensität der Proteinsynthese, die durch den Einbau von ^{14}C -Leucin gemessen wird und weitgehend die Wachstumsleistung der Kalluskulturen reflektiert.

Die Chlorophyllsynthese in Kalluskulturen aus *Crepis capillaris* ist Blaulicht-abhängig. Die *Crepis*-Zellen bilden nur im Blaulicht (oder Weißlicht) Chlorophyll aus, Rotlicht ist unwirksam. Desgleichen werden grüne Kalluskulturen nach 8-10 Wochen Rotlichtbestrahlung chlorophyllfrei. Der Chlorophyllverlust ist jedoch reversibel, denn farblose Kalluskulturen, die seit mehr als 30 Wochen im Rotlicht oder Dunkeln wuchsen, bilden im Blaulicht erneut Chlorophyll aus.

Das Wachstum langfristig adaptierter Kalluskulturen aus *Crepis* kann durch Veränderung der eingestrahlten Lichtqualität erneut beeinflußt werden. Die Frischgewichtszunahme von Kulturen, die seit mehr als 30 Wochen im Hellrotlicht wuchsen, wird durch Bestrahlung mit Dunkelrotlicht oder bei Dunkelkultur signifikant gehemmt. Andererseits kann durch Hellrotlicht das Wachstum der Dunkel- oder Dunkelrotlichtkulturen gefördert werden, jedoch nimmt die Wachstumsförderung nur langsam zu. Nach 6 Wochen sind noch keine eindeutigen Unterschiede vorhanden. Hier liegt offensichtlich eine langsam fortschreitende Adaptation der Zellen vor.

Sowohl die Wiederinduktion der Chlorophyllsynthese als auch die Reaktion langfristig adaptierter Kalluskulturen auf veränderte Lichtbedingungen sprechen dafür, daß sich die Reaktionsnorm der *Crepis*-Zellen im Verlauf mehrmonatiger Subkultur nicht verändert hat.

Gibberellin (10^{-6} bis 10^{-9} g/ml) induziert im Zusammenwirken mit Blaulicht die Regeneratbildung an 4 1/2 Jahre alten *Crepis*-Kulturen. Nach 6-wöchiger Subkultur auf Gibberellin-haltigem Medium werden an ca. 50% der Kalluskulturen im Blaulicht Blätter regeneriert. Die Regenerate entwickeln sich ähnlich wie Blattprimordien exogen an der Oberfläche der Kulturen und bilden kein Wurzelmeristem aus. Die Leitbündel der Blätter enden blind im Kallus. Es ist nicht möglich, durch Gibberellin auch in den chlorophyll-

freien Rotlicht- oder Dunkelkulturen die Regeneratbildung auszulösen.

Verschiedene Fragen, die sich aus diesen Ergebnissen für die Beurteilung von Hypothesen bzw. von anderen Resultaten ergeben werden diskutiert.

LITERATUR

- BANERJI, D. and M. M. LALORAYA - 1967: Chlorophyllformation in isolated cotyledons in the presence of kinetin and chloramphenicol. *Plant and Cell Physiology* 8, 263 - 268.
- BEAUCHESNE, G. et Melle C. POULAIN - 1966: Influence des éclairagements approximativement monochromatique sur le développement de tissus de moelle de tabac cultivés in vitro en présence d'auxine et de kinetine. *Photochemistry and Photobiology* 5, 157 - 167.
- BEAUCHESNE, G., POULAIN, C. and R. LETOUZE - 1970: Les cultures in vitro de tissu de moelle de tabac W. 38 en éclairagements monochromatiques. Photo-inactivation des auxines indoliques. *Physiologia Plantarum* 23, 1101 - 1109.
- BEEVERS, L., LOVEYA, B., PEARSON, J. A. and P.F. WAREING - 1970: Phytochrome and hormonal control of leaf expansion on greening in etiolated wheat leaves. *Planta (Berl.)* 90, 286 - 294.
- BERGMANN, L. und Chr. BERGER - 1966: Farblicht und Plastiden-differenzierung in Zellkulturen von *Nicotiana tabacum* va. "Samsun". *Planta (Berl.)* 69, 58 - 69.
- BJÖRN, L.O., SUZUKI, Y. and J. NILSSON - 1963: Influence of wavelength on the light response of excised wheat roots. *Physiologia Plantarum* 16, 132 - 141.
- BJÖRN, L.O. - 1965: Chlorophyllformation in excised wheat roots. *Physiologia Plantarum* 18, 1130 - 1142.
- BJÖRN, L.O. - 1966: Chlorophyllformation in excised roots of cucumber and pea. *Physiologia Plantarum* 19, 60-62.
- BRUISMA, J. - 1966: Effect of plant regulators on virus production and chlorophyll content of potato leaf disks. *Naturwissenschaften* 53, 281.
- CLARKSON, D.T. and W.S. HILLMAN - 1967: Apparent phytochrome synthesis in pisum tissue. *Nature* 213, 468 - 470.
- CLARKSON, D.T. and W.S. HILLMAN - 1968: Stable concentrations of phytochrome in pisum under continuous illumination with red light. *Plant Physiology* 43, 88 - 92.
- CLEGHORN, R.A. and L. JENDRASSIK - 1934: *Biochem. Z.* 274, 189; zitiert in: Vorschriften zum Eppendorf-Photometer.
- DAS, N.K., PÄTAU, K. and F. SKOOG - 1956: Initiation of mitosis and cell division by kinetin and indol acetic acid in excised tobacco pith tissue. *Physiologia Plantarum* 9, 640 - 651.

- ENGELSMA, G. - 1967: Photoinduction of phenylalanine deaminase in gherkin seedlings. *Planta (Berl.)* 77, 49 - 57.
- ERISMANN, K.H. und F. WEGNER - 1967: Der Einfluß wachstumshemmender Kinetinkonzentrationen auf Chlorophyllgehalt, Photosyntheserate und Stärkeproduktion von *Lemna minor*. *Flora* 158, 433 - 442.
- FEIERABEND, J. - 1969: Der Einfluß von Cytokinin auf die Bildung von Photosynthese-Enzymen in Roggenkeimlingen. *Planta (Berl.)* 84, 11 - 29.
- GAASTRA, - 1961: zitiert in: Nürnbergk, E.L., Kunstlicht und Pflanzenkultur. München, Bonn, Wien. BVL - Verlagsgesellschaft.
- GORHAM, P.R. - 1950: Heterotrophic nutrition of seed plants with particular reference to *Lemna minor*. *Can. J. Res.* 28, 356 - 381.
- HÄCKER, M., K.M. HARTMANN und H. MOHR - 1964: Zellteilung und Zellwachstum im Hypokotyl von *Lactuca sativa* L. unter dem Einfluß des Lichtes. *Planta (Berl.)* 63, 253 - 268.
- HARTMANN, K.M. - 1966: A general hypothesis to interpret "high energy phenomena" of photomorphogenesis on the basis of phytochrome. *Photochemistry and Photobiology* 5, 349 - 366.
- HARTMANN, K.M. - 1967: Phytochrome P730 (Pfr), the effector on the "high energy photomorphogenic reaction" in the far-red region. *Naturwissenschaften* 54, 544.
- HARTMANN, K.M. - 1970: zitiert in: P. Schopfer, Experimente zur Pflanzenphysiologie, Rombach - Paperback, Freiburg.
- HENNIGSEN, A. - 1967: An action spectrum for vesicle dispersal in bean plastids. In: *Biochemistry of Chloroplasts* Vol. II, Edit. T.W. Goodwin, 1967.
- HILLMAN, W.S. - 1957: Nonphotosynthetic light requirement in *Lemna minor* and its partial satisfaction by kinetin. *Science* 126, 165 - 166.
- HINSBERG und LANG - 1951: in: *Medizinische Chemie*, München, Berlin, 1951.
- HÜSEMANN, W. - 1970: Der Einfluß verschiedener Lichtqualitäten auf Chlorophyllgehalt und Wachstum von Gewebekulturen aus *Crepis capillaris* (L.) Wallr. *Plant and Cell Physiology* 11, 315 - 322.
- IKUMA, H. and K.V. THIMANN - 1960: Action of gibberellic acid on lettuce seed germination. *Plant Physiology* 35, 557 - 566.

- JAFFE, M.J. and F.M.R. ISENBERG - 1969: Red light photoenhancement of the synthesis of phenolic compounds and lignin in potato tuber tissue. *Phyton* 26, 51 - 67.
- KAUL, K. and P.S. SABHARWAL - 1971: Effects of sucrose and kinetin on growth and chlorophyll synthesis in tobacco tissue cultures. *Plant Physiology* 47, 691 - 695.
- KLEIN, R.M. - 1964: Repression of tissue culture growth by visible and near visible radiation. *Plant Physiology* 39, 536 - 539.
- KEY, J.L. and J. INGLE - 1964: Requirement for the synthesis of DNA-like RNA for growth of excised plant tissue. *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)* 52, 1382 - 1388.
- KÖHLER, D. - 1966: Die Abhängigkeit der Gibberellinproduktion von Normalerbbsen vom Phytochromsystem. *Planta (Berl.)* 69, 27 - 33.
- KÖHLER, D. - 1966: Veränderungen des Gibberellin gehalts von Salatsamen nach Belichtung. *Planta (Berl.)* 70, 42 - 45.
- MARETZKI, A. and L.G. NICKELL - 1969: Growth of suspension cultures of sugarcane cells in chemically defined media. *Physiologia Plantarum* 22, 117 - 125.
- MILLER, C.O. - 1956: Similarity of some kinetin and red light effects. *Plant Physiology* 38, 414 - 416.
- MILLER, C.O. - 1958: The relationship of kinetin and red light promotions of lettuce seed germination. *Plant Physiology* 33, 115 - 117.
- MILLER, C.O. - 1963: Kinetin and kinetin-like compounds. in: *Modern Methods of Plant Analysis* 6, 194 - 202.
- MOHR, H. - 1956: Die Abhängigkeit des Protonemawachstums und der Protonemapolarität bei Farnen vom Licht. *Planta (Berl.)* 47, 127 - 158.
- MOHR, H. - 1964: The control of plant growth and development. *Biol. Rev.* 39, 87 - 112.
- MOHR, H. - 1969: Photomorphogenesis; in: *Physiology of Plant Growth and Development*. Edit. M.B. Wilkinson, Mc Graw-Hill, London, 1969.
- MOTHES, K. - 1960: Über das Altern der Blätter und die Möglichkeit ihrer Wiederverjüngung. *Naturwissenschaften* 47, 337 - 350.

- MURASHIGE, T. and F. SKOOG - 1962: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco pith cultures. *Physiologia Plantarum* 15, 473 - 497.
- MURASHIGE, T. - 1964: Analysis of the inhibition of organ formation in tobacco tissue culture by gibberellin. *Physiologia Plantarum* 17, 636 - 643.
- NARAIN, A. and M.M. LALORAYA - 1970: Inhibition of chlorophyll synthesis by kinetin in cucumis cotyledons. *Plant and Cell Physiology* 11, 173 - 175.
- NUDEL, U. and E.S. BAMBERGER - 1971: Kinetin inhibition of ^3H Uracil and ^{14}C -Leucin incorporation by tobacco cells in suspension culture. *Plant Physiology* 47, 400 - 403.
- OHNO, Y. and A. FUJIWARA - 1967: Photoinhibition of elongation of roots in rice seedlings. *Plant and Cell Physiology* 8, 141 - 150.
- PÄTAU, K. - 1943: Zur statistischen Beurteilung von Messungsreihen. Eine neue t-Tafel. *Biol. Zbl.* 63, 152 - 168.
- POLEVAYA, V.S. and R.G. BUTENKO - 1966: Significance of spectral composition of light for cell division and elongation in carrot tissue cultures. *Doklady Botanical Sciences* 169, 133 - 134.
- POLEVAYA, V.S. - 1967: Effect of light of different spectral compositions on the growth of isolated carrot tissue cultures. *Soviet Plant Physiology* 14, 41 - 48.
- POWELL, R.D. and M.M. GRIFFITH - 1960: Some anatomical effects of kinetin and red light on disks of bean leaves. *Plant Physiology* 35, 273 - 275.
- POWELL, R.D. and M.M. GRIFFITH - 1962: Effects of kinetin and red light and gamma radiation on growth of disks of bean leaves. *Bot. Gazette* 124, 274 - 278.
- REID, D.M., CLEMENTS, J.R. and D.J. CARR - 1967: Red light induction of gibberellin synthesis in leaves. *Nature* 217, 580 - 582.
- REINERT, J. und H.J. KÜSTER - 1966: Diploide chlorophyllhaltige Gewebekulturen aus Blättern von *Crepis capillaris* (L.) Wallr. *Z. Pflanzenphysiologie* 54, 213 - 222.
- REINERT, J. und J. BESEMER - 1967: Gibberellinsäure, ein Inhibitor morphogenetischer Prozesse. *Wiss. Zschr. Univ. Rostock, Mat.-Nat. R.* 16, 599 - 604.
- REINERT, J. - 1968: Morphogenese in Gewebe- und Zellkulturen. *Naturwissenschaften* 55, 170 - 175.

- RICHMOND, A. and A. LANG - 1957: Effect of kinetin on protein content and survival of detached Xanthium leaves. Science 125, 650 - 651.
- SCHRAUDOLF, H. und J. REINERT - 1959: Interaction of plant growth regulators in regeneration processes. Nature 184, 465 - 466.
- SCHÜRMANN, P. und H. VILLINGER - 1967: Veränderungen des Chlorophyllgehalts und der Chloroplastenfeinstruktur in den Hochblättern von Davidia involucrata. Planta (Berl.) 76, 335 - 347.
- SCOTT, R.A. and J.L. LIVERMANN - 1956: Promotion of leaf expansion by kinetin and benzylaminopurine. Plant Physiology 31, 321 - 322.
- SIMPKINS, I. and H.E. STREET - 1970: Studies on the growth in culture of plant cells. Effects of kinetin on the carbohydrate and nitrogen metabolism of Acer pseudo-platanus L. cells grown in suspension culture, Journal of experimental Botany 21, 170-185.
- STREET, H.E. - 1966: Nutrition and metabolism in plant cultures. in: Cells and Tissues in Culture. Edit. by E.N. Willmer Academic Press, London, 1966.
- STREET, H.E. and G.G. HENSHAW - 1966: Introduction and methods employed in plant tissue culture. in: Cells and Tissues in Culture. Edit. E.N. Willmer, Academic Press, London, 1966.
- VLASOVA, M.P., DROZDOVA, I.S. and N.P. VOSKRESENSKAYA - 1971: Changes in the fine structure of the chloroplasts in pea plants greening under blue and red light. Soviet Plant Physiology 18, 1 - 8.
- VOSKRESENSKAYA, N.P., NECHAEVA, E.P., VLASOVA, M.P. and A.A. NICHIPOROVICH - 1968: Significance of blue light and kinetin for restoration of the photosynthetic apparatus of aging barley leaves. Soviet Plant Physiology 15, 747 - 755.
- WAGNER, H. und G. MICHAEL - 1971: Der Einfluß unterschiedlicher Stickstoffversorgung auf die Cytokininbildung in Wurzeln von Sonnenblumenpflanzen. Biochem. Physiol. Pflanzen 162, 147 - 158.
- WEISS, J.S. and M.J. JAFFE - 1969: Photoenhancement by blue light of organogenesis in tobacco pith cultures. Physiologia Plantarum 22, 171 - 176.
- WITHAM, F.H. - 1968: Effect of 2,4-D on the catokinin requirement of soybean cytoledon and tobacco stem pith tissues. Plant Physiology 43, 1455 - 1457.
- ZIEGLER, R. und K. EGLE - 1965: Zur quantitativen Analyse der Chloroplastenpigmente. Beiträge zur Biologie der Pflanzen 41, 11 - 63.

Die vorliegende Dissertation wurde vom Sommer 1968
bis zum Winter 1972 im Pflanzenphysiologischen
Institut der Freien Universität Berlin durchgeführt.
Für Themastellung, Anregungen und Kritik zur Arbeit
danke ich Herrn Prof. Dr. J. Reinert.

L e b e n s l a u f

Am 27. Juni 1939 wurde ich, Wolfgang Hüsemann, als Sohn des Mittelschulrektors Heinrich Hüsemann und seiner Ehefrau Anne-Lies, geb. Fuhs in Buer, Bez. Osnabrück geboren.

Vom Herbst 1945 bis zum April 1950 besuchte ich die Volksschule und anschließend bis 1953 die Mittelschule in Buer. Im April 1953 wechselte ich auf das "Neusprachliche Gymnasium" in Melle und legte dort im März 1959 die Reifeprüfung ab. Vom April 1959 bis zum März 1960 leistete ich meinen Grundwehrdienst bei der Bundeswehr ab und anschließend arbeitete ich bis zum September als Praktikant in einem Industriebetrieb. Zum Wintersemester 1960/61 begann ich mein Studium für das Lehramt an Höheren Schulen mit den Fächern Biologie, Chemie und Geographie an der Freien Universität Berlin. Das 5. und 6. Semester studierte ich an der Christian-Albrecht-Universität in Kiel und setzte zum Wintersemester 1963/64 mein Studium an der Freien Universität Berlin fort. Das Staatsexamen bestand ich am 21. Mai 1968.

Am 1.7.1968 wurde ich mit der Wahrnehmung einer Assistentenstelle beauftragt und begann meine Promotionsarbeit am Pflanzenphysiologischen Institut unter der wissenschaftlichen Anleitung von Prof. Dr. J. Reinert. Seit dem 30.10.1969 bin ich wissenschaftlicher Assistent am Pflanzenphysiologischen Institut..

Meine akademischen Lehrer waren: Prof. Dr. J. Reinert, Prof. Dr. H. Clauss, Prof. Dr. H.J. Küster, Prof. Dr. Th. Eckardt, Prof. Dr. J. Christophersen (Botanik); Prof. Dr. W. Ullrich, Prof. Dr. K. Urich, Prof. Dr. A. Remane, Prof. Dr. W. Herre (Zoologie); Prof. Dr. H. Lüers (Allgemeine Biologie und Genetik); Prof. Dr. K.F. Jahr, Prof. Dr. G. Manecke, Prof. Dr. H. Gnichtel (Chemie); Prof. Dr. Dr. J.H. Schultze, Prof. Dr. Blume, Prof. Dr. G. Jensch (Geographie).

Druck: PHOTO COPIE W. Hilke KG., 1 Berlin 30, Motzstraße 64

